

**Mikrovaskuläre Mechanismen der hyperakuten und akut humoralen
Abstoßungsreaktion nach experimenteller Herz-Xenotransplantation im
Hamster-Ratte-Modell**

Dominik Geiger



München 2015

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Mikrovaskuläre Mechanismen der hyperakuten und akut humoralen
Abstoßungsreaktion nach experimenteller Herz-Xenotransplantation im
Hamster-Ratte-Modell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Geiger
aus Bad Saulgau
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. René Schramm, PhD

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel

Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die aktuelle Situation der Herztransplantation in Deutschland und der Eurotransplant-Zone	- 1 -
1.2 Die Geschichte der xenogenen Herztransplantation	- 3 -
1.3 Die Auswahl der Spenderspezies	- 5 -
1.4 Mechanismen der Abstoßung nach xenogener Transplantation	- 6 -
1.4.1 Die hyperakute Abstoßungsreaktion	- 7 -
1.4.2 Die akut vaskuläre (humorale) Abstoßungsreaktion	- 9 -
1.4.3 Die akut zelluläre Abstoßungsreaktion	- 10 -
1.4.4 Die chronische Abstoßungsreaktion	- 11 -
1.5 Strategien zur Verhinderung der Transplantatabstoßung	- 11 -
1.5.1 Strategien zur Überwindung der HAR	- 11 -
1.5.2 Strategien zur Überwindung der AVR	- 12 -
1.5.3 Ansätze zur Verhinderung der ACR und der CAR	- 13 -
1.6 Physikalische Grundlagen der Intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie (IVM)	- 14 -
1.7 Fragestellung	- 16 -
2. Material und Methoden	- 17 -
2.1 Versuchstiere	- 17 -
2.2 Operatives Vorgehen	- 17 -
2.2.1 Anästhesie	- 17 -
2.2.2 Explantation des Hamsterherzens	- 18 -
2.2.3 Implantation des Hamsterherzens an die Halsgefäße der Ratte	- 19 -
2.2.4 Versuche zur hyperakuten Abstoßung	- 21 -
2.2.5 Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung	- 21 -
2.2.6 Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation	- 21 -
2.3 Aufbau und Durchführung der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie	- 21 -
2.4 Auswertung der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie	- 23 -
2.5 Klinische Chemie	- 24 -
2.6 Histologie	- 25 -
2.6.1 Hämatoxylin – Eosin – Färbung	- 25 -
2.6.2 Auswertung der histologischen Präparate	- 25 -
2.7 Versuchsgruppen	- 26 -
2.8 Statistik	- 26 -

3. Ergebnisse	- 27 -
3.1 Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie	- 27 -
3.1.1 Venuläre Blutflussgeschwindigkeit	- 29 -
3.1.2 Volumetrischer Blutfluss	- 30 -
3.1.3 Leakage	- 31 -
3.1.4 Fest adhärenente Leukozyten	- 32 -
3.1.5 Rollende Leukozyten	- 33 -
3.1.6 Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten	- 34 -
3.1.7 Fest adhärenente Thrombozyten	- 35 -
3.1.8 Rollende Thrombozyten	- 36 -
3.1.9 Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten	- 37 -
3.1.10 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der intravitale Multifluoreszenzmikroskopie	- 38 -
3.2 Klinische Chemie	- 39 -
3.2.1 Klinische Chemie Gruppe 1 (Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation)	- 40 -
3.2.2 Klinische Chemie Gruppe 2 (Versuche zur hyperakuten Abstoßung)	- 40 -
3.2.3 Klinische Chemie Gruppe 3 (Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung)	- 40 -
3.3 Histologien	- 42 -
3.3.1 Kontrollen	- 43 -
3.3.2 Histologieschnitte der Gruppe 1 (Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation)	- 44 -
3.3.3 Histologieschnitte Gruppe 2 (Versuche zur hyperakuten Abstoßung)	- 45 -
3.3.4 Histologieschnitte Gruppe 3 (Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung)	- 46 -
3.4 Überlebenszeit der Hamsterherz-Grafts der Versuchgruppen 2 und 3	- 47 -
4. Diskussion	- 48 -
4.1 Diskussion von Material und Methoden	- 48 -
4.1.1 Tiermodell	- 48 -
4.1.2 Heterotope Herztransplantation	- 49 -
4.1.3 Intravitalmikroskopie	- 51 -
4.1.4 Versuchsprotokoll	- 53 -
4.2 Diskussion der Ergebnisse	- 55 -
4.2.1 Mikrozirkulation	- 55 -
4.2.2 Klinische Chemie	- 56 -
4.2.3 Histologie	- 58 -
4.2.4 Überlebenszeit der Grafts	- 59 -
5. Zusammenfassung	- 61 -

6. Abkürzungsverzeichnis	- 63 -
7. Abbildungsverzeichnis	- 65 -
8. Tabellenverzeichnis	- 66 -
9. Literaturverzeichnis	- 67 -
10. Danksagungen	- 73 -
11. Eidesstattliche Versicherung	- 74 -

1. Einleitung

Die terminale Herzinsuffizienz stellt derzeit die häufigste Indikation zur allogenen Herztransplantation dar. Trotz der großen Fortschritte bei der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz, wie z.B. der Resynchronisationstherapie oder der Optimierung der medikamentösen Therapie, ist die Herztransplantation häufig dennoch die letzte Therapieoption. Klassische Indikationen zur Herztransplantation sind eine irreversible Herzerkrankung (NYHA IV) mit einer voraussichtlichen Überlebensdauer des Patienten von 6 – 12 Monaten, bzw. einer voraussichtlichen 1-Jahres-Überlebensrate ohne Herztransplantation von < 50 %. Die Grunderkrankung darf nach der Transplantation allerdings nicht fortschreiten (Meiser et al., 1997). Die 1-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantation beträgt international mittlerweile über 80 % und die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt immerhin noch über 70% (DSO, 2011).

Eines der führenden Probleme in der Transplantationsmedizin ist der Mangel an geeigneten Spenderorganen (vgl. 1.1). Aufgrund dieser Knappheit stellt die Xenotransplantation, d.h. die Transplantation zwischen Individuen zweier unterschiedlicher Spezies, eine mögliche Lösung dieses Problems dar. Allerdings ist die Xenotransplantation noch weit von der Implementierung in die klinische Routine entfernt, was sich hauptsächlich auf das noch nicht gelöste Problem der komplexen Abstoßungsmechanismen nach xenogener Transplantation zurückführen lässt (Lin et al., 2009).

Während die hyperakute Abstoßung (HAR) zumindest präklinisch durch die Verwendung von gentechnisch veränderten Spenderorganen beherrscht werden kann, stellt die akut humorale Abstoßung (AHR) ein noch weitgehend ungelöstes Problem dar (Lin et al., 2009).

Sowohl bei der HAR, als auch bei der AHR xenogen transplanteder Organe kommt es zu Störungen der Mikrozirkulation mit Thrombosen, welche schließlich zum Funktionsverlust des Spenderorgans führen (Shimizu et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues experimentelles Modell zur in vivo Analyse der mikrovaskulären Mechanismen während der HAR und der AHR etabliert und erstmalig die Koagulopathie mittels intravital Multifluoreszenzmikroskopie qualitativ und quantitativ ausgewertet.

1.1 Die aktuelle Situation der Herztransplantation in Deutschland und der Eurotransplant-Zone

Eines der führenden Probleme der Transplantationsmedizin, insbesondere auch in der Herz-Transplantationsmedizin, ist der wachsende Mangel an geeigneten Spenderorganen.

In der Eurotransplant-Zone, zu welcher die Länder Belgien, Niederlande, Luxemburg, Deutschland, Österreich, Slowenien, Ungarn und Kroatien gehören, waren im Jahre 2010 946 Spenderherzen

verfügbar. Von diesen 946 Spenderherzen wurden 750 Herzen von Transplantationszentren der Eurotransplant-Zone akzeptiert und hiervon wiederum nur 631 Herzen transplantiert. Auf der aktiven Herztransplantationswarteliste wurden in diesem Zeitraum allerdings 1226 Patienten geführt. 1158 dieser Patienten warteten auf eine Herztransplantation und 68 Patienten warteten neben einem Spenderherzen noch auf ein weiteres Spenderorgan. D.h. im Jahr 2010 fehlten in der Eurotransplant-Zone absolut, also Patienten auf aktiver Warteliste minus transplantierte Herzen, 595 Spenderherzen. In Deutschland, dem größten Land der Eurotransplant-Zone, zeigt sich eine ähnliche Situation. Hier berichtet Eurotransplant 2010 über 534 verfügbare Spenderherzen, von denen 456 akzeptiert und 385 transplantiert wurden. Auf der aktiven Warteliste befanden sich aber alleine in Deutschland 981 Patienten. 929 Patienten benötigten eine Herztransplantation und 52 Patienten benötigten noch ein weiteres Spenderorgan.

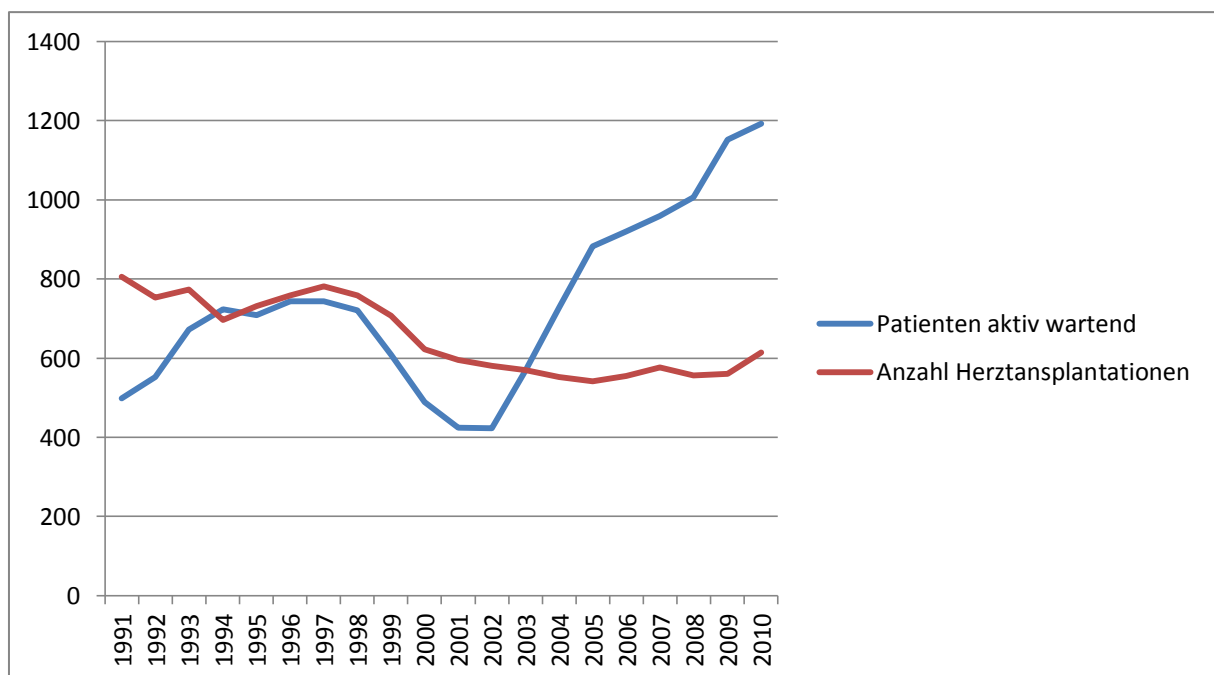


Abb. 1.1: Dynamik der Eurotransplant Herz-Warteliste und Transplantationen 1991 – 2010 (Eurotransplant International Foundation, 2011)

Die Wartezeit der 2010 auf der Warteliste geführten Patienten, welche eine Herztransplantation benötigten, wird in Abbildung 1.2 dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass über die Hälfte der auf der Warteliste geführten Patienten über ein Jahr auf ein Spenderorgan warten. Aufgrund der langen Wartezeit versterben allerdings viele Patienten während dieser Zeit oder ihr Zustand verschlechtert sich so sehr, dass für sie eine Herztransplantation nicht mehr in Frage kommt.

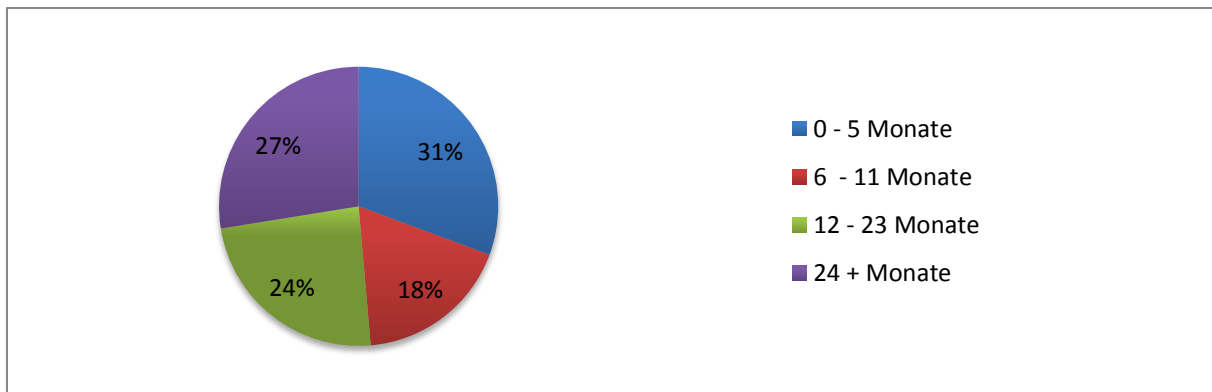


Abb. 1.2: Wartezeit 2010 auf der Herztransplantationswarteliste (Eurotransplant International Foundation, 2011)

1.2 Die Geschichte der xenogenen Herztransplantation

Die ersten Xenotransplantationen wurden mit Zellen und Geweben durchgeführt. Erst später wurden Organe, aufgrund der fehlenden operativen Technik zur Kontrolle von Blutungen und der Anastomosierung von Gefäßen, xenogen transplantiert (Deschamps et al., 2005). Die erste dokumentierte xenogene Bluttransfusion von einem Lamm auf einen 15 jährigen Jungen mit akutem Fieber fand bereits im Jahre 1667 in Paris statt (Farr, 1980). Da der Junge nach der Transfusion von seinem Fieber geheilt war, fand die xenogene Bluttransfusion einige Anhänger, allerdings mit mäßigem Erfolg. Deshalb wurde die Transfusion von tierischem Blut im Jahre 1670 zuerst vom Französischen Parlament, dann vom Englischen Parlament und dem Papst verboten.

Nachdem die beiden Franzosen Mathieu Jaboulay und Alexis Carrel zu Beginn des 20. Jahrhunderts verschiedene chirurgische Techniken zur Anastomosierung von Blutgefäßen entwickelt hatten, war auch der Weg zur xenogenen Transplantation von vaskularisierten Organen geebnet (Carrel, 1902; Deschamps et al., 2005). Das am häufigsten xenogen transplantierte Organ war zu dieser Zeit die Niere, da es sich hierbei um ein paariges und von einer einzigen Arterie versorgtes Organ handelt, dessen Funktion man einfach an der Produktion von Urin beweisen konnte (Deschamps et al., 2005). Doch auch hier gab es aufgrund der fehlenden Immunsuppression einige Rückschläge, so dass ca. 40 Jahre bis in die 1960er Jahre keine xenogenen Transplantationen stattfanden.

Bereits knapp vier Jahre vor der ersten allogenen Herztransplantation durch Christiaan Barnard führte James Hardy am 23. Januar 1964 die erste xenogene Herztransplantation durch. Er transplantierte ein Schimpansenherz an einen 68 jährigen Mann im kardiogenen Schock. Der Patient verstarb aber nur 90 Minuten nach der Transplantation, wofür Hardy die zu kleine Größe sowie den schlechten Zustand des Patienten verantwortlich machte (Hardy et al., 1964). Die Daten aus dieser Zeit schließen aber auch eine hyperakute Abstoßung nicht aus (Deschamps et al., 2005).

Nach weiteren Fehlversuchen (siehe Tab. 1.1) mit nur kurzem Überleben der Patienten aufgrund der nicht verfügbaren Immunsuppression gelang Leonard Bailey im Oktober 1984 erstmals eine kleine Sensation. Er transplantierte einem 12 Tage alten Mädchen, das Stephanie Fae Beauclair hieß und in der Presse als „Baby Fae“ bekannt wurde, das Herz eines AB0-inkompatiblen Pavians. Das Kind überlebte 20 Tage. In der Autopsie fanden sich Zeichen einer akut humoralen Abstoßungsreaktion (Bailey et al., 1985). Ihm gelang somit erstmalig die hyperakute Abstoßungsreaktion mittels Immunsuppression und der Auswahl eines immunologisch geeigneten Organs zu überwinden. Dennoch löste die Transplantation eine ethische Debatte aus, so dass bis zum Jahre 1992 keine weiteren Versuche einer Xenotransplantation unternommen wurden.

Die darauffolgenden Xenotransplantationen in den Jahren 1992 und 1996 waren, trotz nun besserer immunsuppressiver Möglichkeiten, wenig erfolgreich, so dass seit 1996 über keine weiteren Versuche Tierherzen an Menschen zu transplantieren berichtet wurde.

Jahr	Autor	Ort	Tier	Fall	Überleben
1964	Hardy	Jackson, MS, USA	Schimpanse	68 jähriger Mann	90 Min.
1968	Ross	London, UK	Schwein	48 jähriger Mann	4 Min.
1968	Cooley	Austin, TX, USA	Schaf	48 jähriger Mann	10 Min.
1969	Marion	Lyon, Frankreich	Schimpanse	Junge Frau	„kurz“
1977	Barnard	Kapstadt, Südafrika	Pavian	25 jährige Frau	5,5 Std.
			Schimpanse	60 jähriger Mann	4 Tage
1984	Bailey	Loma Linda, CA, USA	Pavian	14 Tage altes Baby	20 Tage
1992	Religa & Czaplicki	Sosnowiec, Polen	Schwein	31 jähriger Mann	23 Std.
1996	Baruah	Sonapur, Indien	Schwein	32 jährige Frau	7 Tage

Tab. 1.1: Geschichte der Herz-Xenotransplantation (Deschamps et al., 2005).

1.3 Die Auswahl der Spenderspezies

Im Allgemeinen muss man konkordante und diskordante Xenotransplantationsmodelle voneinander unterscheiden (Calne, 1970).

Von einer konkordanten Xenotransplantation spricht man, wenn die Transplantation zwischen phylogenetisch nahe verwandten Spezies durchgeführt wird. Hier wird das Transplantat nicht hyperakut abgestoßen und die Abstoßungsreaktion ähnelt der Abstoßung eines Alлотransplantats. Unter einer Alлотransplantation versteht man die Transplantation zwischen genetisch nicht-identischen Spendern und Empfängern derselben Spezies. Beispiele für eine konkordante Xenotransplantation sind die Transplantationen zwischen nicht humanem Primat (z.B. Pavian) und Mensch, Ratte und Maus oder Hamster und Ratte (Zhang et al., 2000).

Bei der diskordanten Xenotransplantation, d.h. bei der Transplantation zwischen Spezies mit phylogenetisch weitem Abstand, wird das Transplantat hingegen hyperakut abgestoßen. Diese Abstoßungsreaktion wird durch präformierte Antikörper hervorgerufen und führt zu einem Transplantatversagen innerhalb von Minuten bis Stunden. Beispiele hierfür sind Transplantationen zwischen Schwein und Mensch oder Meerschweinchen und Ratte (Zhang et al., 2000).

Aufgrund der immunologischen Kompatibilität scheint für den Menschen also eine konkordante Xenotransplantation, z.B. von nicht humanen Primaten auf den Menschen, erfolgsversprechender zu sein. Allerdings besteht hier eine Reihe von Gründen, welche gegen die Verwendung von nicht humanen Primaten als Spendertiere sprechen:

- Wegen der hohen Entwicklungsstufe und nahen Verwandtschaft zum Menschen bestehen ethische Bedenken nicht humane Primaten als Spendertiere zu benutzen (Cozzi & Ancona, 2003).
- Des Weiteren könnten Organe, welche adulten humanen Organen am ehesten entsprächen, nur von stark gefährdeten und unter Schutz stehenden Primaten gewonnen werden (Daar, 1997).
- Außerdem bestehen eine lange Generationszeit sowie hohe Kosten für die Haltung und Pflege von Primaten (Cozzi & Ancona, 2003).
- Nicht zu unterschätzen ist zudem das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten, welches bei phylogenetisch eng verwandten Spezies vermutlich erhöht ist. Insbesondere ist hier die Übertragung endogener Retroviren zu nennen (Chapman et al., 1995).

Derzeit scheint das Schwein, trotz der ungünstigeren immunologischen Bedingungen in Bezug auf die Transplantatabstoßung, der geeignetste Spender für eine xenogene Organtransplantation auf den Menschen zu sein. Die Gründe hierfür sind unter anderem:

- Im Vergleich zu Primaten sind die ethischen Bedenken eher zu vernachlässigen, da Schweine schon seit langer Zeit zur Lebensmittelgewinnung gehalten werden und auch Medizinprodukte, wie Insulin und Herzklappen, von Schweinen gewonnen werden (Fryer et al., 1995).
- Schweineherzen besitzen eine hohe anatomische und physiologische Ähnlichkeit mit humanen Herzen (Hammer et al., 1998).
- Schweine besitzen eine relativ kurze Generationszeit und können günstig und in hohen Zahlen gezüchtet werden (Cozzi & Ancona, 2003).
- Auch das Risiko der Übertragung von Krankheiten auf den Menschen ist nicht so hoch wie bei Primaten. So können Schweine unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gezüchtet werden. Zwar kann die Übertragung von porcinen endogenen Retroviren (PERV) nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bisher gibt es aber keine Hinweise auf eine Übertragung (Simon et al., 2005).
- Ebenso spricht die Möglichkeit der genetischen Modifikation von Schweineorganen für die Verwendung von Schweinen als Spendertiere (Lai et al., 2002).

1.4 Mechanismen der Abstoßung nach xenogener Transplantation

Die Immunantworten nach Allo- und Xenotransplantation haben viele Gemeinsamkeiten. Beiden ist beispielsweise gemeinsam, dass sie eine zelluläre und eine antikörpervermittelte Komponente enthalten. Der Hauptunterschied besteht aber in der Existenz von präformierten natürlichen Antikörpern (PNAK) bei der Xenotransplantation. Während die Abstoßungsreaktion nach Allotransplantation hauptsächlich durch das erworbene Immunsystem und durch Inkompatibilität der MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) verursacht wird, spielen bei der Abstoßungsreaktion von xenogenen Organen sowohl das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem eine Rolle (Zhang et al., 2000).

Organe werden nach einer diskordanten Xenotransplantation zunächst hyperakut und akut humoral abgestoßen. Diese Abstoßungsreaktionen sind hauptsächlich antikörpervermittelt. Falls die hyperakute und akut humorale Abstoßungsreaktion verhindert werden konnte spricht man von Akkommodation, einem Zustand, in dem das Transplantat dieser Antikörper-vermittelten Abstoßungen zu widerstehen scheint. Dennoch kann das Xenotransplantat wieder Ziel einer akut zellulären und

chronischen Abstoßungsreaktion werden. Diese Abstoßungsreaktionen ähneln mehr oder weniger den korrespondierenden Abstoßungsreaktionen nach Allotransplantation (Platt, 2001).

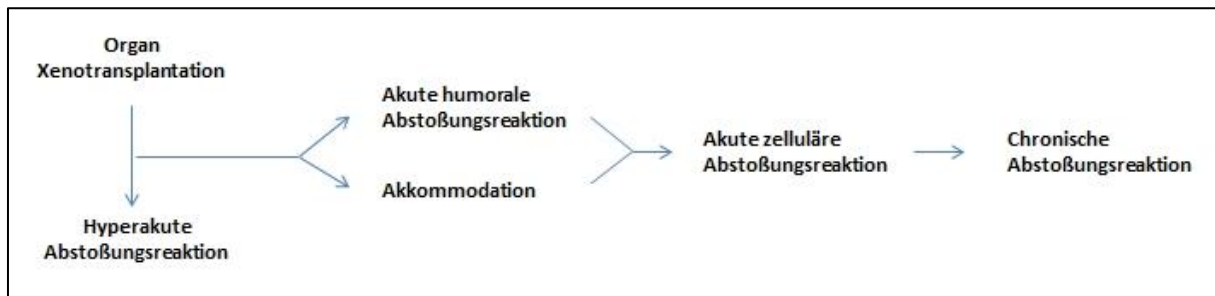


Abb. 1.3: Die Phasen der Immunantwort nach Xenotransplantation (Platt, 2001)

1.4.1 Die hyperakute Abstoßungsreaktion

Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) führt innerhalb von Minuten bis Stunden zum Versagen des Transplantats (Lin et al., 1998). Grundlage dieser Abstoßungsreaktion bilden präformierte natürliche Antikörper (PNAK) des Empfängers gegen Antigene auf dem Endothel des Transplantats (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966). Diese Antigene wurden 1992 durch Good et al. entdeckt, wobei die meisten PNAK gegen Galaktose- $\alpha(1,3)$ Galaktose-Epitope (GAL) gerichtet sind (Good et al., 1992). Synthetisiert werden die GAL von der $\alpha(1,3)$ Galaktosyltransferase ($\alpha(1,3)$ GT), welche von niedrigeren Säugetieren und Neuweltaffen exprimiert wird, nicht jedoch von Altweltaffen, Menschenaffen und Menschen (Galili et al., 1987). Spezies, die die $\alpha(1,3)$ GT nicht exprimieren, zeigen hohe Level an Antikörpern (AK) gegen GAL (Roos et al., 2001). Die PNAK, die folglich bei Altweltaffen, Menschenaffen und Menschen nachweisbar sind, finden sich aber nicht schon von Geburt an im Serum, sondern bilden sich sehr früh in der Kindheit als Reaktion auf die Besiedelung des Dickdarmes mit Bakterien (Cramer, 2000). Hauptsächlich gehören diese Antikörper den Klassen IgM und IgG an, wobei das Verhältnis dieser AK von Individuum zu Individuum variieren kann (Roos & Daha, 2002). Diese xenoreaktiven AK führen nach einer diskordanten Xenotransplantation dazu, dass das Komplementsystem auf dem klassischen Weg aktiviert wird. Aber auch die Aktivierung des Komplementsystems auf dem alternativen Weg, über die Interaktion mit der xenogenen Oberfläche ohne Beteiligung von AK, trägt zu HAR bei (vgl. Abb. 1.4) (Robson, 1999).

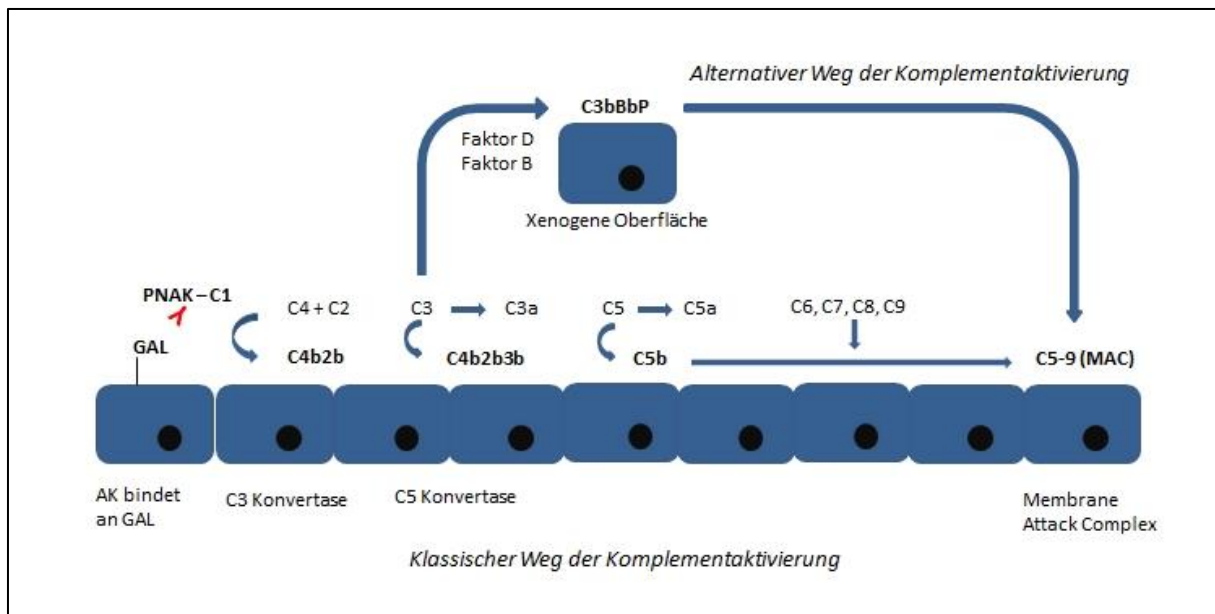


Abb. 1.4: Komplementaktivierung (verändert nach Hoopes, 1996)

Am Ende der Komplementkaskade steht die Bildung des Membrane-Attack-Complex (MAC), der einen Hauptanteil zur HAR beiträgt. Der MAC kann entweder über direkte Zelllyse oder über die Formation von Poren in die Zelloberfläche zu Nekrosen im Transplantat führen. Daneben kann der MAC aber auch die Apoptose von Zellen einleiten. Außerdem verliert der Zellverbund xenogen transplantierte Organe durch die Exposition mit Xenoantikörpern und Komplementfaktoren seine Integrität, was sich durch interzelluläre Lücken ausdrückt und somit für die zu beobachtende vaskuläre Undichtigkeit (Leakage) verantwortlich sein könnte. Des Weiteren kommt es zu einem Verlust von Heparansulfat auf der Zelloberfläche und zu einer vermehrten Expression von Thromboplasmin (engl. tissue factor), wodurch eine stark pro-koagulatorische Oberfläche geschaffen und die Bildung von intravasalen Thromben gefördert wird. Eine weitere Komponente ist die proinflammatorische Wirkung des MAC, der durch die Bindung an der Zelloberfläche zur Aktivierung einer Signalkaskade und zur Transkription von Genen führt, woraus letztendlich die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen und die Produktion von Zyto- und Chemokinen resultiert. Auf diesem Weg wird die Adhäsion von Leukozyten sowie die Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen gefördert (Roos & Daha, 2002).

Neben dem MAC tragen aber auch frühere Komplementfaktoren proinflammatorische Effekte im Rahmen der HAR bei. Die Faktoren C3a, C4a und C5a (so genannte Anaphylatoxine) wirken z.B. chemotaktisch und können auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren, die von Eosinophilen, Neutrophilen und Mastzellen exprimiert werden, binden und so zu proinflammatorischen Effekten führen (Roos & Daha, 2002).

Hinzu kommt, dass xenoreaktive AK der Klasse IgG mit den Fc-Rezeptoren von Phagozyten und Natürlichen-Killerzellen interagieren und diese aktivieren, was ebenfalls zu einer

Transplantaterstörung führt (Roos & Daha, 2002). Insbesondere ist hierbei eine deutliche prokoagulatorische Stimulation von Bedeutung.

Histologisch zeigen sich bei der HAR thrombotische Gefäßverschlüsse, diffuse Hämorrhagien, ödematöse Schwellungen, entzündliche Infiltrate, fleckige Nekroseareale, sowie Ablagerungen von Komplementfaktoren, Immunglobulinen und Fibrin im Kapillarbereich des Transplantats (Platt et al., 1991).

1.4.2 Die akut vaskuläre (humorale) Abstoßungsreaktion

Die AVR kann bereits in den ersten 24 Stunden nach der Xenotransplantation beginnen und innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen zum Transplantatversagen führen (Lin et al., 1998).

Verursacht wird sie durch eine Endothelzellaktivierung, welche zu proinflammatorischen und prokoagulatorischen Veränderungen der Oberfläche führt (Platt et al., 1998).

Die genauen Mechanismen der Endothelzellaktivierung sind noch nicht vollständig geklärt. Es spielen aber höchstwahrscheinlich mehrere Faktoren eine Rolle. Zum einen scheinen xenoreaktive Antikörper, genauer gesagt präformierte und induzierte AK gegen GAL, sowie induzierte Anti-Non-GAL-AK, bei der Aktivierung eine bedeutende Rolle zu spielen (Platt, 2001). Des Weiteren sind wahrscheinlich auch Komplementfaktoren, Makrophagen, Natürliche-Killerzellen, Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten sowie die molekulare Inkompatibilität, v.a. in Bezug auf die Regulation der Gerinnungskaskade zwischen Spender und Empfänger, an der Endothelzellaktivierung beteiligt (vgl. Abb. 1.5) (Platt et al., 1998; Robson et al., 1999).

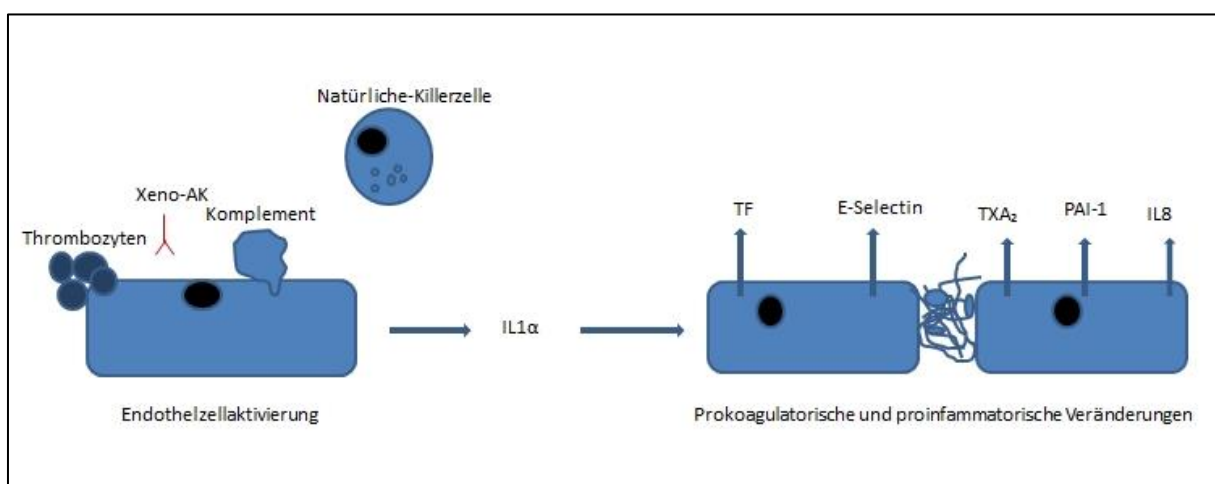


Abb. 1.5: Pathogenese der AVR (verändert nach Platt, 1998).

Im Rahmen der Endothelzellaktivierung kommt es unter anderem zu einer de novo Expression von Tissue Factor (TF) und Plasminogenaktivator Inhibitor-1 (PAI-1), welche ein prothrombotisches Milieu

fördern. Außerdem führt die Expression von E-Selektin, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und Interleukinen zu einem Einstrom sowie der Aktivierung von Entzündungszellen. Gleichzeitig wird auch noch die subendotheliale Matrix (u.a. Kollagen und von-Willebrand-Faktor) freigegeben, was außerdem die Thrombozytenaggregation fördert (Platt et al., 1998).

Dies alles mündet darin, dass thrombotische Gefäßverschlüsse und die immunzellenvermittelte Zelllyse zu einer Infarzierung des Spenderorgans führen.

Histologisch ist das Bild der akut vaskulären (humoralen) Abstoßungsreaktion dem der hyperakuten Abstoßungsreaktion sehr ähnlich. Es finden sich Endothelzellrupturen, interstitielles Ödem, Hämorrhagien, Immunglobulin- und Komplementablagerungen, Infiltration mononukleärer Zellen und Thrombenbildung (Pino-Chavez, 2001).

1.4.3 Die akut zelluläre Abstoßungsreaktion

Falls die HAR und AVR überwunden werden können, kommt es innerhalb von wenigen Wochen nach Xenotransplantation zur akut zellulären Abstoßungsreaktion (ACR) (Zhang et al., 2000). Man nimmt an, dass die ACR nach Xenotransplantation der ACR nach Allotransplantation sehr ähnlich ist. Grundlage der ACR ist die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf die fremden Oberflächenproteine des Xenotransplantats. Die T-Zellen können entweder auf dem direkten Weg, durch MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) der Klasse I auf antigenpräsentierenden Zellen, oder auf dem indirekten Weg, nach Antigenprozessierung durch MHC-Molekülen der Klasse II, aktiviert werden. Im Gegensatz zur Allotransplantation, scheinen bei der Xenotransplantation neben den MHC-Molekülen aber auch noch weitere Protein-Antigene eine Rolle zu spielen. Hieraus resultiert, dass eine größere Vielfalt an T-Zellen aktiviert werden kann. Man geht deshalb davon aus, dass die xenogene ACR mindestens genauso stark wie die allogene ACR ist. Der T-Zell-Aktivierung folgt über verschiedene Signalwege vermittelt die Einwanderung zytotoxischer Zellen in das Transplantat (Platt, 2001).

Allerdings ist diese Form der Abstoßung bei Xenotransplantaten noch wenig erforscht, da sie aufgrund der AVR selten auftritt und durch Immunsuppressiva gut beherrscht werden kann.

Histologisch ist die ACR durch multifokale Lymphozyteninfiltration von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und wenigen Natürlichen-Killerzellen, sowie direkter Myozytenschädigung charakterisiert. Vaskuläre Thrombosen und interstitielle Hämorrhagien fehlen typischerweise. Ebenso sind vaskuläre Ablagerungen von Immunglobulinen, Komplement oder Fibrin eher gering oder sie fehlen (Pino-Chavez, 2001).

1.4.4 Die chronische Abstoßungsreaktion

Die chronische Abstoßungsreaktion (CAR) tritt Wochen bis Monate nach Xenotransplantation auf und ist bisher noch wenig erforscht, da sie im xenogenen Modell noch selten beobachtet werden konnte. Nach allogener Herztransplantation stellt die CAR den limitierenden Faktor für das Langzeitüberleben dar. Welche Rolle sie im Rahmen der Xenotransplantation spielt, ist bisweilen aber noch weitgehend unklar (Shen et al., 1998).

Man nimmt an, dass die histopathologischen Veränderungen der CAR nach Xenotransplantation ähnlich derer nach allogener Transplantation sind (Ekser & Cooper, 2010). Charakterisiert ist die CAR bei der allogenen Herztransplantation durch koronararterielle Läsionen mit konzentrischer Intimaverdickung, hervorgerufen durch Intimaproliferation, Wucherung glatter Muskulatur, interstitieller Fibrosierung und Infiltration durch mononukleäre Zellen (Shen et al., 1998). Diese führen im Verlauf zu chronischer Ischämie und konsekutivem Myokarduntergang.

1.5 Strategien zur Verhinderung der Transplantatabstoßung

Es existieren mehrere Möglichkeiten die Transplantatabstoßung zu verhindern bzw. abzuschwächen. Die hyperakute Abstoßungsreaktion kann mittlerweile gut beherrscht werden, allerdings stellt die akute vaskuläre Abstoßung ein bisher noch nicht suffizient gelöstes Problem dar.

1.5.1 Strategien zur Überwindung der HAR

- Elimination des GAL-Epitops im Spender

Dies gelingt mit sog. Knock-out-Schweinen, bei denen das GAL-Transferase-Gen entfernt wurde und die deshalb das GAL-Epitop nicht mehr exprimieren (Tseng et al., 2005). Eine weitere Methode ist die Herstellung transgener Schweine, die die Fucosyltransferase exprimieren, ein Enzym das mit der GAL-Transferase um ein Substrat konkurriert, wodurch die Expression der GAL-Epitope reduziert wird (Sandrin et al., 1995). Außerdem können transgene Schweine hergestellt werden, die die humane α -Galactosidase exprimieren. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das GAL-Epitope auf der Endotheloberfläche spaltet (LaVecchio et al., 1995).

- Entfernung der PNAK im Empfänger

Es existieren mehrere Möglichkeiten die xenoreaktiven Immunglobuline aus dem Serum des Empfängers zu entfernen. Die wohl gebräuchlichsten Methoden sind die Antikörper mittels extrakorporaler Immunadsorption oder Plasmapherese präoperativ zu entfernen (Leventhal et al.,

1995). Bei diesen Verfahren werden allerdings Antikörper unspezifisch eliminiert, was eine Schwächung des Immunsystems des Empfängers zur Folge hat. Eine spezifischere Möglichkeit zur Entfernung der PNAK ist die Infusion löslicher GAL-Epitope, welche an eine Trägersubstanz gekoppelt sind, und die die Antikörper binden (Teranishi et al., 2003). Ein weiteres spezifischeres Verfahren ist die präoperative Perfusion eines Organs des Spenders mit dem Blut des Empfängers (Cooper et al., 1988).

- Inhibition des Komplementsystems

Durch die Gabe von löslichen Komplementregulatoren wie Cobra-Venom-Faktor (CVF), Komplement-Rezeptor Typ I (sCR1), C1-Esterase-Inhibitor, DAF (decay accelerating factor), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis) oder MCP (membrane cofactor protein), gelingt es das Komplementsystem zu blockieren bzw. es zu hemmen (Kobayashi et al., 1997). Alternativ hierzu besteht die Möglichkeit der Herstellung transgener Schweine, welche humane Komplementregulatoren auf ihrem Endothel exprimieren und so das Komplementsystem hemmen (Zhou et al., 2005).

1.5.2 Strategien zur Überwindung der AVR

- Entfernung der induzierten Antikörper

Dies kann durch regelmäßige Immunadsorption des Empfängerblutes oder regelmäßige Gabe von löslichen GAL-Epitopen geschehen (vgl. Strategien zur Umgehung der HAR).

- Elimination/Inhibition der B-Zellen

Ziel der Elimination der B-Zellen ist es die Antikörperproduktion zu minimieren. Beschriebene Verfahren hierfür sind die Splenektomie und die Bestrahlung lymphatischen Gewebes (Kozlowski et al., 1998). Weitere medikamentöse Verfahren sind Antikörper gegen CD20 (Rituximab) oder Cyclophosphamid, einem Zytostatikum. Zudem kann über eine Co-Stimulations-Blockade die T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen verhindert werden (Kuwaki et al., 2004).

- Verhinderung der Endothelaktivierung

Die Verhinderung der Endothelzellaktivierung kann mittels verstärkter Expression protektiver Gene versucht werden (Bach et al., 1997).

- Induktion immunologischer Toleranz

Eine Methode zur Induktion der immunologischen Toleranz ist die präoperative Transplantation hämatopoetischer Stammzellen des Spenders an den Empfänger. Hierdurch soll erzielt werden, dass durch negative Selektion spenderreaktive T-Zellen eliminiert werden (Ogata & Platt, 2004).

- Induktion der Akkommodation

Von Akkommodation wird gesprochen, wenn trotz suffizientem Immunsystem das Spenderorgan nicht abgestoßen wird. Die genauen Mechanismen der Akkommodation sind bis heute noch weitestgehend unverstanden. Man geht davon aus, dass sich das Immunsystem nach einer gewissen Zeit an das Transplantat „gewöhnt“. Dies könnte z.B. durch strukturelle Änderung der Antikörper oder Antigene geschehen, aber auch die vermehrte Expression protektiver Gene wird in Betracht gezogen. Zur Induktion der Akkommodation ist es wichtig, dass präoperativ eine intensive Immunsuppression mit Entfernung der xenoreaktiven Antikörper erfolgt (Bach et al., 1997).

1.5.3 Ansätze zur Verhinderung der ACR und der CAR

- Immunsuppressiva

Die zelluläre Transplantatabstoßung nach xenogener Organtransplantation wurde bisher nur selten beobachtet. Man geht aber davon aus, dass die Mechanismen denen nach Allotransplantation ähneln und somit die Therapie mit bekannten Immunsuppressiva aus der Allotransplantation vielversprechend ist. Bewährte Immunsuppressiva aus der Allotransplantation sind Calcineurininhibitoren, wie Tacrolimus oder Cyclosporin A, sowie Mycophenolat Mofetil, Cyclophosphamid und Kortikosteroide. Außerdem spielt die Prophylaxe einer CMV-Infektion, z.B. mit Ganciclovir, und die Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren eine große Rolle.

1.6 Physikalische Grundlagen der Intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie (IVM)

Diese Methode zur Beurteilung der mikrozirkulatorischen Vorgänge am schlagenden Herzen wurde von Schramm (Schramm et al., 2007) bereits bei heterotop transplantierten Mäuseherzen beschrieben.

Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass bei der Bestrahlung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Licht bestimmter Wellenlängen (Anregungslicht) die Fluoreszenzfarbstoffe Lichtquanten emittieren können. Grundlage hierfür ist, dass durch die Bestrahlung mit Licht Energie zugeführt wird. Bestimmte Elektronen der fluoreszenzfähigen Moleküle absorbieren dabei Photonen und werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da dies aber ein instabiler Zustand für das Molekül ist, können sich die Elektronen nicht auf diesem Niveau halten und fallen quasi im selben Augenblick auf das ursprüngliche, energieärmere Niveau zurück. Die bei diesem Vorgang freiwerdende Energie wird teilweise wieder als Fluoreszenzlicht emittiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht hat dabei weniger Energie, d.h. eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht.

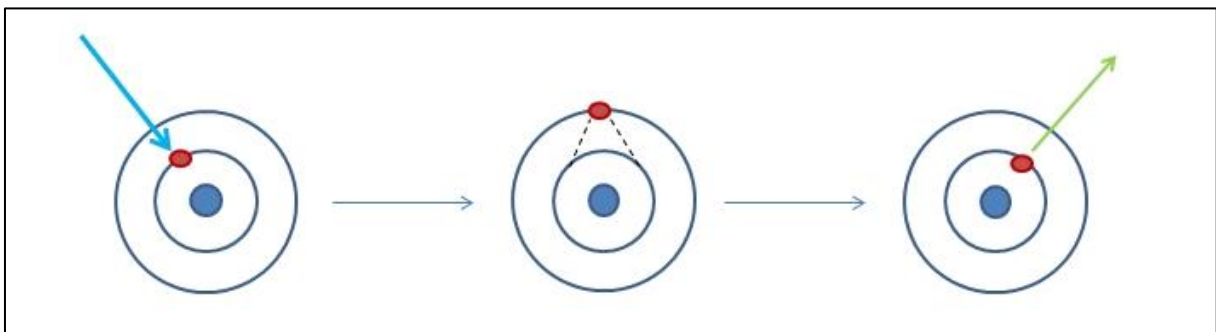


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes auf Atomebene.

Die Filteranordnung im Epifluoreszenzmikroskop erlaubt es, zwischen Anregungslicht und Fluoreszenzlicht zu unterscheiden (vgl. Abb. 1.7). Das von der Lichtquelle des Mikroskops kommende Licht muss zunächst den Anregungsfilter passieren. Dieser Filter ist so beschaffen, dass er aus dem breiten Spektrum des von der Lichtquelle ausgestrahlten Lichts nur die Wellenlänge, die zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendig ist, passieren lässt. Dieses nun nahezu einfarbige Licht trifft auf den Fluoreszenzfarbstoff und regt diesen zur Emission energieärmerer Lichtquanten an. Diese Lichtquanten und ein Teil des Anregungslichtes das reflektiert wurde, treffen nun auf den Sperrfilter, der nur für das längerwellige Fluoreszenzlicht durchlässig ist und das Anregungslicht absorbiert. Der Bildaufbau erfolgt letztendlich aus dem verbleibenden Fluoreszenzlicht (Lichtman & Conchello, 2005).

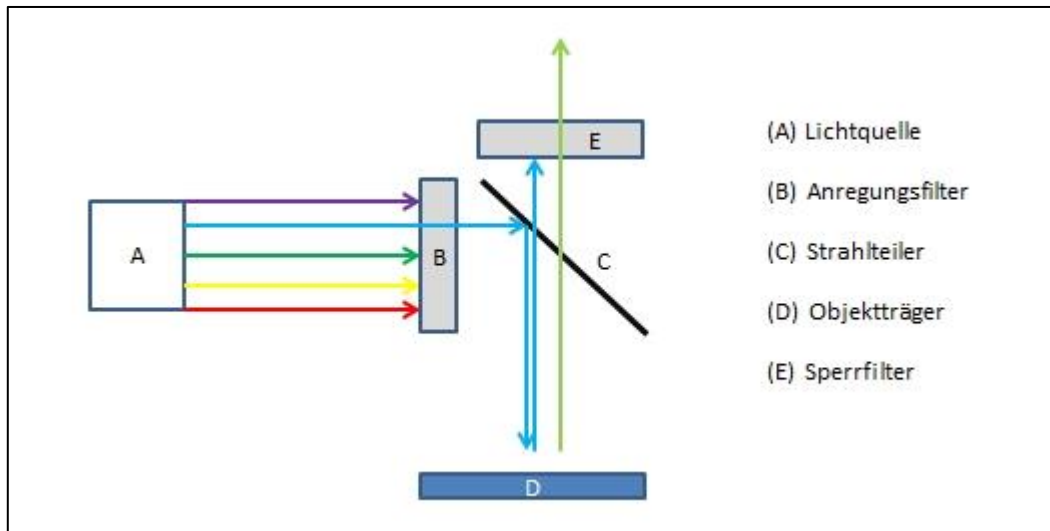


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Strahlenganges im Epifluoreszenzmikroskop (verändert nach Lichtman & Conchello, 2005).

1.7 Fragestellung

Der immer größer werdende Mangel an geeigneten Spenderorganen, insbesondere im Bereich der Herztransplantationsmedizin, stellt die moderne Transplantationsmedizin vor eine große Aufgabe. Trotz gesteigerter Utilisation durch modernere Allokationsmodelle und OP-Techniken geht die Schere zwischen umgesetzten Herztransplantationen und der Zahl wartender Patienten weiter auseinander. Die xenogene Herztransplantation könnte einen Lösungsansatz für dieses Problem darstellen und zumindest eine Brückenfunktion haben, bis ein geeignetes humanes Spenderorgan verfügbar ist. Bedauerlicherweise ist die xenogene Herztransplantation noch weit von der klinischen Implementierung entfernt.

Die xenogene Abstoßungsreaktion, insbesondere die akut humorale Abstoßung, stellt die bislang größte Hürde zur klinischen Implementierung der xenogenen Herztransplantation dar. Vor allem die reaktive Koagulopathie sowie deren mikrovaskuläre Mechanismen sind noch wenig verstanden und konnten seither im Tiermodell (Schwein > Pavian) noch nicht suffizient beherrscht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, ein neues experimentelles Modell zur in vivo Analyse der mikrovaskulären Mechanismen während der hyperakuten und akut humoralen Abstoßungsreaktion im Kleintiermodell zu etablieren.

Außerdem werden erstmalig die zellulären und mikrovaskulären Mechanismen der Koagulopathie während der hyperakuten und akuten Abstoßungsreaktion mittels intravitaler Multifluoreszenzmikroskopie quantitativ und qualitativ in vivo analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Syrische Goldhamster (weiblich, 60 – 100 g Körpergewicht) und Lewis-Ratten (weiblich, 150 – 200 g Körpergewicht), die von Charles River (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) bezogen wurden.

Die Tiere wurden in den Tierräumen des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der LMU München in Käfigen (Typ III) mit einem Besatz von maximal zwei Tieren gehalten. Standard-Futter und Wasser standen zur freien Verfügung und durch eine geregelte Beleuchtung wurde ein 12-Stunden-Tag- und 12-Stunden-Nacht-Rhythmus gewährleistet. Regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen (nach FELASA) sicherten den hygienischen Standard. Zudem wurde darauf geachtet, dass keine Verhaltensauffälligkeiten oder sonstige Veränderungen wie struppiges Fell auf einen krankhaften Zustand der Tiere hindeuteten.

2.2 Operatives Vorgehen

Die angewandte operative Technik wurde von Matsuura (Matsuura et al., 1991) beschrieben und geringfügig modifiziert (Schramm et al., 2006).

Die operativen Eingriffe wurden mit Hilfe eines Kleintieroperationsmikroskops (M651, Leica Microsystems, Bensheim) und mikrochirurgischen Operationsinstrumenten durchgeführt.

2.2.1 Anästhesie

Die Narkotisierung der Versuchstiere erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von 6 mg pro 100 g Körpergewicht einer Pentobarbital-Natrium-Lösung (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos). Anschließend wurde am tief narkotisierten Tier durch intramuskuläre Injektion von 15 mg pro kg Körpergewicht Piritramid (Dipidolor®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) die Analgesie durchgeführt.

Durch die intermittierende Bolusgabe von Pentobarbital-Natrium und Piritramid bei Bedarf wurde die tiefe Analgosedierung aufrechterhalten, bis der akute Versuch bzw. das operative Prozedere beendet war.

2.2.2 Explantation des Hamsterherzens

Zur Explantation des Spenderherzens wird beim analgosedierten Hamster zunächst eine mediane Laparatomie durchgeführt. Nach der Verlagerung der Darmschlingen aus dem Abdomen wird über die Vena cava inferior (VCI) 100IE Heparin-Natrium (B. Braun, Melsungen) injiziert und das Tier somit vollständig antikoaguliert. Anschließend wird die Injektionsstelle kurz komprimiert und der Darm zurück in den Situs verlagert um eine größere Blutung zu verhindern.

Nun wird der Schnitt der Laparatomie zur medianen Sternotomie weitergeführt und somit der Thorax eröffnet. Es folgt die beidseitige Phrenotomie und das Auseinanderspreizen der Thoraxhälften. Das schlagende Herz wird mit einer in 4°C kalter Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen) getränkten Kompresse bedeckt und etwas nach rechts verlagert, um die thorakale Aorta descendens präparieren zu können. Nun wird die Aorta nach vorheriger Inzision retrograd mit einer 22 Gauge (G) Venenverweilkanüle (Introcan Safety®, B. Braun, Melsungen) kanüliert. Nach vorheriger Inzision der VCI knapp oberhalb der Leber wird mit der Organperfusion des Herzens mit 4°C kalter Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) nach Bretschneider (Custodiol®, Dr. F. Koehler Chemie, Alsbach-Haehnlein) für zehn Minuten mit einem Druck von 100 cmH₂O begonnen.

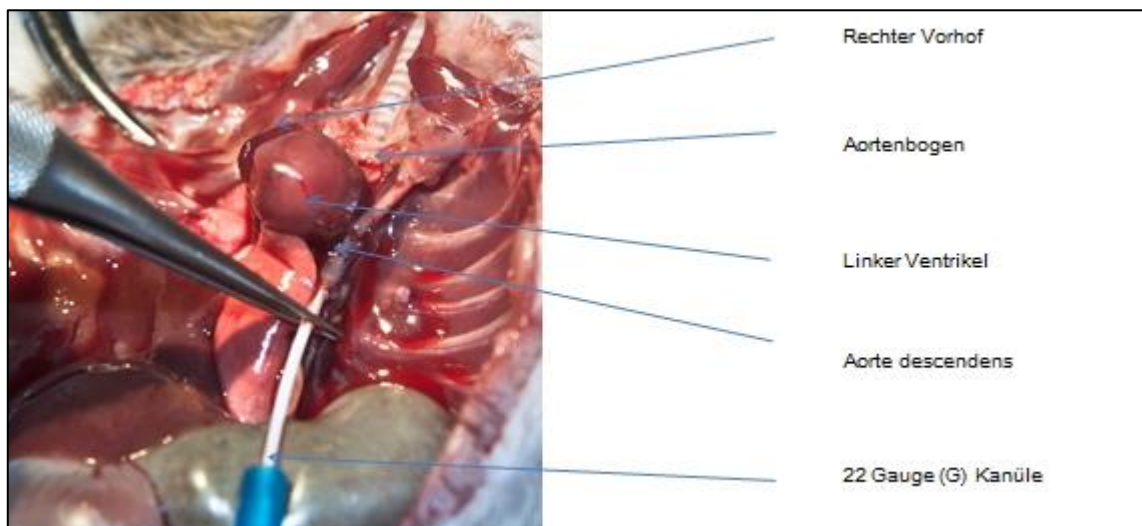


Abb. 2.1: Perfusion des Hamsterherzens mit Bretschneider-Lösung bei der Explantation.

Während der Perfusion des Herzens mit HTK-Lösung werden bereits der Aortenbogen und der Truncus pulmonalis präpariert um diese später absetzen zu können. Nach erfolgter Perfusion wird die VCI kurz vor ihrer Mündung in den rechten Vorhof mit einer 7-0 monofilen Polypropylnaht (Prolene®, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Die Aorta wird nun proximal direkt nach dem Abgang des Truncus brachiocephalicus abgesetzt. Selbiges geschieht mit dem Truncus pulmonalis kurz vor der

Bifurkation der Pulmonaläste. Abschließend werden alle anderen Gefäße, die zum Herzen und vom Herzen weg führen, durch eine Massenligatur hinter dem Herzen verschlossen und abgesetzt.

Das Herz wird nun in einen Behälter mit 4°C kalter HTK-Lösung gelegt und direkt zum Empfänger gebracht. Während der Entnahme ist darauf zu achten, dass das Herz durch kalte NaCl-Lösung gekühlt und feucht gehalten wird, um die topischen Organschäden möglichst gering zu halten.

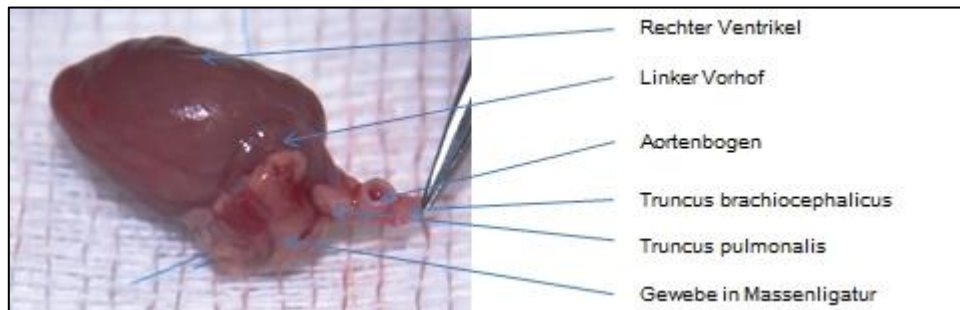


Abb. 2.2: Explantiertes Hamsterherz kurz vor der Implantation.

2.2.3 Implantation des Hamsterherzens an die Halsgefäße der Ratte

Mit der Präparation der Halsgefäße der Ratte wird schon während der Explantation des Herzens des Hamsters begonnen, um das Spenderherz direkt nach der Explantation implantieren zu können und so die Ischämiezeit so kurz wie möglich zu halten. Hierzu wird die analgosedierte Ratte in Rückenlage auf einer Wärmeplatte gelagert um die normale Körpertemperatur von ca. 37,5°C aufrechtzuerhalten. Es folgt eine paramediane Inzision der Haut vom Kieferwinkel bis zum Sternum. Zunächst wird die V. jugularis interna langstreckig freipräpariert sowie die Seitenäste ligiert und abgesetzt. Nun wird die V. jugularis interna weit proximal durch einen Mikrogefäßclip abgeklemmt und möglichst weit distal durch eine 7-0 monofile Polypropylennaht (Prolene®, Ethicon, Norderstedt) ligiert und abgesetzt. Nachfolgend wird das Cuff, welches zuvor aus einer 18 G Venenverweilkanüle (Introcan Safety®, B. Braun, Melsungen) vorbereitet wurde, über die V. jugularis interna gezogen und das freie Ende der Vene über das Cuff gestülpt und mit einem 9-0 monofilen Polypropylenfaden (Prolene®, Ethicon, Norderstedt) fixiert (vgl. Abb. 2.3). Anschließend wird das Ende mit einer Heparin-Natrium-Lösung 5 IE pro 100 µl (B. Braun, Melsungen) gespült.

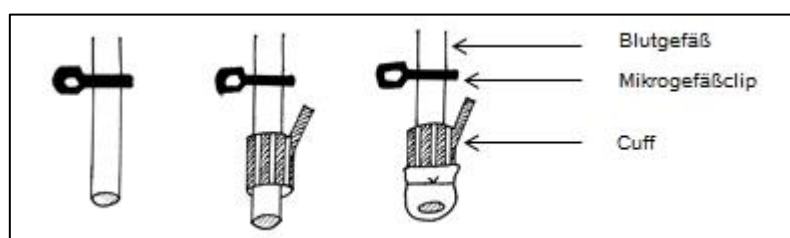


Abb. 2.3: Anbringung des Cuffs (verändert nach Matsuura, 1991).

Nun wird die A. carotis communis durch die Durchtrennung des M. sternocleidomastoideus freigelegt und wie bereits bei der V. jugularis interna beschrieben, langstreckig freipräpariert. Auch auf die A. carotis communis wird, nach vorheriger proximaler Anbringung des Mikrogefäßclips und nach distaler Ligatur und Absetzung, unter gleicher Vorgehensweise wie bei der Vene, ein Cuff, angefertigt aus einer 22 G Venenverweilkanüle (Introcan Safety®, B. Braun, Melsungen), angebracht.

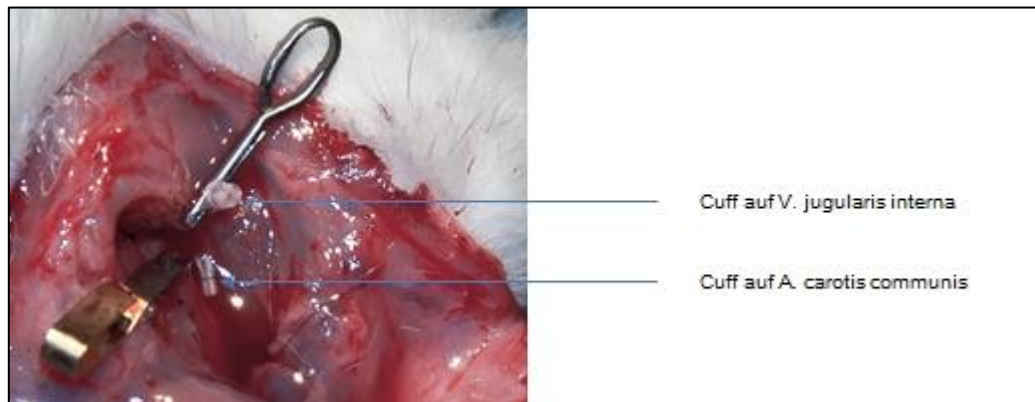


Abb. 2.4: Ratte mit angebrachten Cuffs auf V. jugularis interna und A. carotis communis.

Bei der Implantation wird zunächst die Aorta ascendens des Spenderherzens über das Cuff der A. carotis communis des Empfängertieres und der Truncus pulmonalis des Spenderherzens über das Cuff der V. jugularis interna des Empfängertieres gestülpt und jeweils durch Ligaturen mit einem 9-0 monofilen Polypropylenfaden (Prolene®, Ethicon, Norderstedt) auf den Cuffs fixiert. Anschließend wird, durch das Entfernen der Mikrogefäßklemmen von der A. carotis communis und der V. jugularis interna, mit der Reperfusion begonnen.

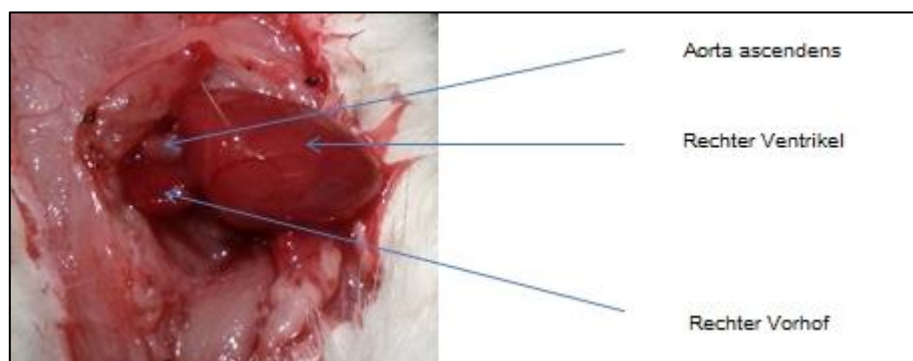


Abb. 2.5: Reperfusion des Spenderherzens nach Transplantation an die Halsgefäße der Ratte.

2.2.4 Versuche zur hyperakuten Abstoßung

Um die Bildung von xenoreaktiven Antikörpern zu triggern und so eine hyperakute Abstoßungsreaktion zu provozieren wurden einige Ratten sieben bis zehn Tage vor der eigentlichen Transplantation des Hamsterherzens mit 1 ml heparinisierten Hamsterblut sensibilisiert. Hierzu wurde einem Hamster in tiefer Analgosedierung (vgl. 2.2.1) nach paramedianer Inzision vom Kieferwinkel zum Sternum 1 ml Blut aus der Vena jugularis interna entnommen und der Ratte, ebenfalls in Analgosedierung, intraabdominell injiziert. Die Wunde am Hals des Hamsters wurde durch eine Hautnaht verschlossen und sowohl der Hamster als auch die Ratte erwachten wieder aus der Narkose. Sieben bis zehn Tage später erfolgte die Transplantation des Hamsterherzens an die Halsgefäße der Ratte, wie oben beschrieben.

2.2.5 Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung

Um die Abstoßung nach xenogener Herztransplantation zwischen Hamster und Ratte in ihrer Gesamtheit zu beurteilen wurden diese Versuche durchgeführt. Hierzu erfolgten die Transplantationen des Hamsterherzens, wie oben beschrieben, allerdings wurden die Operationswunden unmittelbar nach erfolgreicher Transplantation über dem Transplantat wieder verschlossen. Nachdem die Ratten wieder aus der Narkose erwachten, wurde durch zweimal tägliche Palpation des Spenderherzens die Vitalität des Transplantates geprüft. Der Zeitpunkt der vollständigen Abstoßung wurde durch den Verlust einer palpablen Herzaktion definiert.

2.2.6 Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation

Um die mikrozirkulatorische Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation zwischen Hamster und Ratte akut beurteilen zu können erfolgte die Transplantation des Hamsterherzens wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Ratten noch immer in tiefer Analgosedierung zum Multifluoreszenzmikroskop gebracht und die Mikrozirkulation der Hamsterherzen zu den Zeitpunkten $t=30$ Minuten und $t=90$ Minuten nach Reperfusion wie unten beschrieben mikroskopiert.

2.3 Aufbau und Durchführung der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie

Zu intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie wurde dem Empfängertier ca. zehn Minuten vor der Untersuchung eine Mischung aus 0,1 ml Natrium-Fluoreszein (0,76 mg/ml) (SIGMA Chemical Co., St.

Louis, USA) und 0,2 ml Rhodamin-6G (1 mg/ml) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) in das retrobulbäre Venengeflecht injiziert. Durch das Natrium-Fluoreszein kann das Blutplasma bei grünem Licht ($\lambda = 560 \text{ nm}$) und durch das Rhodamin-6G die korpuskulären Blutbestandteile bei blauem Licht ($\lambda = 510 \text{ nm}$) mittels Epi-Illumination sichtbar gemacht werden. Nach der Injektion der Farbstoffe wurde die Ratte in Rückenlage unter das Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Bensheim), das an eine 100 Watt Quecksilber Lichtquelle (Leitz, Wetzlar) gekoppelt war, gelegt und ein Objektglas in horizontaler Ausrichtung über dem rechten Ventrikel fixiert. Um eine Kompression der epikardialen Gefäße zu verhindern wurde das Deckglas, das auf der Unterseite mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung versehen wurde, von einem Mikromanipulator fixiert. Zur Darstellung der epikardialen Oberfläche und der Mikrozirkulation wurden ferner Immersionsobjektive mit 10x (Leitz Wetzlar, PL FLUOTAR, *160/-, 10/0,30) und 25x (Leitz Wetzlar, Fluoreszenz, 160/0,17, 25/0,60) Vergrößerung verwendet, somit wurde einer Vergrößerung von 66 bzw. 165 erreicht. Als Immersionsmedium zwischen Deckglas und Objektiv wurde Ultraschallgel auf Wasserbasis (Sonosid®, ASID BONZ GmbH, Herrenberg) verwendet. Die Bilder der Intravitalmikroskopie (IVM) wurden von einer Kamera (FK6990, Pieper GmbH, Schwerte) gefilmt und von einem Videorekorder (Panasonic AG7350, Matsushita Electric Ind. Co., Tokyo, Japan), an den ein Videotimer (VTG-33, FOR-A Company, Tokyo, Japan) gekoppelt war, auf S-VHS-Bänder (Super VHS PRO 240, FUJIFILM Recording Media GmbH, Kleve) aufgezeichnet.

Die rechtsventrikuläre Mikrozirkulation wurde zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 90 Minuten nach Beginn der Reperfusion untersucht.

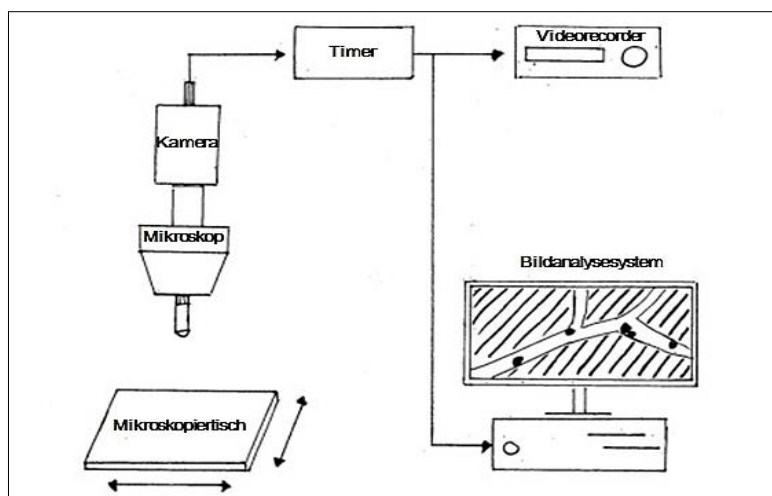


Abb. 2.6: Versuchsaufbau der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie (verändert nach Menger, 1993).

2.4 Auswertung der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der bei der IVM aufgenommenen Bilder erfolgte mittels eines computergestützten Bildanalyse-Systems (Cap-Image 7.3, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg). Hierbei wurden folgende Zielparameter in den subepikardialen, postkapillären Koronarvenolen erhoben:

- Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]

Diese wurde durch die Bestimmung der Geschwindigkeit frei fließender Zellen mit der Line-Shift-Methode ermittelt. Hierbei wurden pro Gefäßabschnitt die Geschwindigkeiten 3-mal bestimmt, deren Mittelwert die Blutflussgeschwindigkeit im Gefäß ergab.

- Volumetrischer Blutfluss [pL/s]

Der volumetrische Blutfluss ergab sich aus dem gemessenen mittleren Durchmesser des Gefäßes und der bestimmten Blutflussgeschwindigkeit und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumetrischer Blutfluss} \left[\frac{\text{pL}}{\text{s}} \right] = \text{Blutflussgeschwindigkeit} \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right] * \left(\frac{\text{Gefäßdurchmesser} [\mu\text{m}]}{2} \right)^2 * \pi$$

- Leakage [%]

Die Leakage beschreibt die vaskuläre Permeabilität im Bereich der beobachteten Gefäßabschnitte für das Natrium-Fluoreszein. Gemessen wurde die Leakage durch die Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz von Natrium-Fluoreszein intra- und extravasal bei Epi-Illumination mit blauem Licht. Das Verhältnis dieser Werte zueinander gibt die Gefäßpermeabilität (Leakage) an.

- Leukozyten-Endothel-Interaktion

Zur Ermittlung der Leukozyten-Endothel-Interaktion wurden in einem definierten venulären Gefäßabschnitt sowohl die fest an der Endothelwand haftenden Leukozyten (Sticker), als auch die entlang der Gefäßwand rollenden Leukozyten (Roller) über einen Zeitraum von 20 Sekunden bestimmt. Die Sticker [n/mm²] waren jene Leukozyten, die während dieses Zeitraums fest an der Endothelwand anhafteten. Als Roller [n/min/mm²] wurden jene Leukozyten definiert, die sich deutlich langsamer als die frei fließenden Leukozyten im Gefäßsegment an der Gefäßwand entlang bewegten. Außerdem wurde mittels der Line-Shift-Methode die Geschwindigkeit [mm/s] der Roller analog zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit gemessen.

- Thrombozyten-Endothel-Interaktion

Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde analog zur Leukozyten-Endothel-Interaktion bestimmt. Auch hier wurden sowohl die fest an der Gefäßwand haftenden (Sticker [n/mm²]) und die rollenden Thrombozyten (Roller [n/min/mm²]), als auch die Geschwindigkeit [mm/s] der rollenden Thrombozyten ermittelt. Die Rhodamin 6G-gefärbten interagierenden Thrombozyten wurden von Leukozyten durch ihre unterschiedliche Größe differenziert.

2.5 Klinische Chemie

Nach Beendigung der Versuche wurden in allen Versuchsgruppen Blutproben der Empfängertiere gewonnen. Hierzu wurde an der narkotisierten Ratte zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt und die VCI, nach Verlagerung der Darmschlingen aus dem Abdomen, dargestellt und mit einer Kanüle punktiert. Das entnommene Blut aus der VCI wurde auf jeweils ein Serum-, Citrat- und EDTA-Röhrchen verteilt. Aus dem EDTA-Röhrchen wurde zunächst im laboreigenen Hämatologiesystem (Coulter® Ac T8, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) ein Blutbild angefertigt, bevor die Proben zur weiteren Analyse in das Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Campus Großhadern) per Rohrpost gesendet wurden. Folgende Parameter wurden dort bestimmt:

Entnahmemedium	Parameter	Abkürzung	Einheit
Serum	Kalium	K	mmol/l
	Creatinkinase	CK	U/l
	Troponin I	Trop I	ng/ml
	Myoglobin	Myo	ng/ml
Citrat	Quick	Q	%
	International Normalized Ratio	INR	
	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	aPTT	sec
	aPTT-Ratio	aPTT-R	
	Fibrinogen	Fibr	mg/dl
	Antithrombin	AT	%
	D-Dimer	D-Dim	µg/ml
EDTA	Leukozyten	Leu	G/l
	Erythrozyten	Ery	T/l
	Hämoglobin	Hb	g/dl
	Thrombozyten	Throm	G/l

Tab. 2.1: Parameter der klinischen Chemie

2.6 Histologie

In allen Versuchsgruppen wurde nach der Beendigung der Versuche sowohl das Spender- als auch das Empfängerherz explantiert, um diese später histologisch aufzuarbeiten und zu untersuchen. Hierzu wurde nach der Blutentnahme (s.o.) eine mediane Sternotomie am Empfängertier durchgeführt, und nach beidseitiger Phrenotomie, das Empfängerherz durch die Durchtrennung der zu- und ableitenden Gefäße explantiert. Das Spenderherz wurde durch die Diskonnektion der Cuff-Anastomosen entnommen.

Die Herzen wurden zunächst für 48 Stunden in 4%igem Formaldehyd gelagert, dann für eine Stunde gewässert und anschließend in 70%igem Ethanol bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.6.1 Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Vor der Färbung der Präparate wurden die Herzen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und der Alkohol durch den aromatischen Kohlenwasserstoff Xylol wieder entfernt. Anschließend wurden die Herzen in Paraffinwachs eingebettet und mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Schichten geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend auf einem Objektträger fixiert. Letztlich wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und schließlich eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) in einer aufsteigenden Alkoholreihe angefertigt. Hierbei wurden mit Hämalun die basophilen Strukturen wie die Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum blau gefärbt und mit Eosin die azidophilen Strukturen, v.a. die Zytoplasmaproteine, rot gefärbt.

2.6.2 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der HE-gefärbten histologischen Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX41, Tokyo, Japan) mit angeschlossener digitaler Kamera (Olympus C-5050 Zoom, Tokyo, Japan). Die histologischen Schnitte wurden von zwei unabhängigen Auswertern verblindet anhand des unten aufgeführten Scores (Tab. 2.2) beurteilt.

Parameter	keine	wenig	mittel	viele
Nekrosen	0	1	2	3
Hämorrhagien	0	1	2	3
Okkludierte Gefäße	0	1	2	3
Mononukleäre Zellinfiltrate	0	1	2	3

Tab. 2.2: Histologie-Score zur Beurteilung der xenogenen Abstoßungsreaktion.

2.7 Versuchsgruppen

Um die mikrovaskulären Mechanismen der hyperakuten und akuten Abstoßungsreaktion zu untersuchen wurden drei Versuchsgruppen angelegt.

- Gruppe 1 (n=12): Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation.
Heterotope Transplantation von Herzen Syrischer Goldhamster an die Halsgefäße von Lewis-Ratten und intravitale Multifluoreszenzmikroskopie der subepikardialen Gefäße des rechten Ventrikels.
- Gruppe 2 (n=5): Versuche zur hyperakuten Abstoßung.
Heterotope Transplantation von Herzen Syrischer Goldhamster an die Halsgefäße von Lewis-Ratten, welche sieben bis zehn Tage zuvor durch die intraabdomielle Injektion von einem Milliliter heparinisierten Hamsterblut gegen Rattenantigene sensibilisiert wurden, und so die Bildung von Xeno-Antikörpern stimuliert wurde.
- Gruppe 3 (n=5): Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung.
Heterotope Transplantation von Herzen Syrischer Goldhamster an die Halsgefäße von Lewis-Ratten und anschließender Verschluss der Operationswunde. Anschließend wurde durch zweimal tägliche Palpation der Herzaktion des transplantierten Hamsterherzens der Zeitpunkt der vollständigen Organabstoßung bestimmt.
- Kontroll-Gruppen: Als Kontrollgruppe zum Vergleich der klinischen Chemie diente natives Rattenblut, das durch eine Punktion der Vena jugularis interna von Lewis-Ratten gewonnen wurde (n=8). Die Kontrollgruppe zur Auswertung der Histologie-Schnitte bildeten die nativen Rattenherzen, die den Ratten nach Versuchsende entnommen wurden (n=18).

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit Hilfe der Software SigmaStat (Version 3.1, Jandel Corporation, San Rafael, California, USA).

Unverbundene Stichproben zweier Gruppen wurden im Falle einer Normalverteilung mittels Student's t-Test und falls keine Normalverteilung gegeben war, mittels Rangsummen-Test (Mann-Whitney-Test) miteinander verglichen.

Das statistische Signifikanzniveau wurde mit der Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit die mikrozirkulatorischen Vorgänge in den rechtsventrikulären, subepikardialen Koronargefäßen darzustellen und sowohl qualitativ als auch quantitativ auszuwerten wurde erreicht. Mittels intravitaler Multifluoreszenzmikroskopie konnten alle Gefäßsegmente dargestellt werden, wobei dies bei Arteriolen und arteriovenösen Übergängen nur vereinzelt gelang. Die Ergebnisse beschränken sich deshalb auf die Mikrozirkulation der Venolen.

3.1 Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie

Die Venolen wurden anhand der Flussrichtung, der fehlenden Pulswelle und der niedrigeren Flussgeschwindigkeit von den Arteriolen unterschieden. Alle der genannten Parameter wurden in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen gemessen.

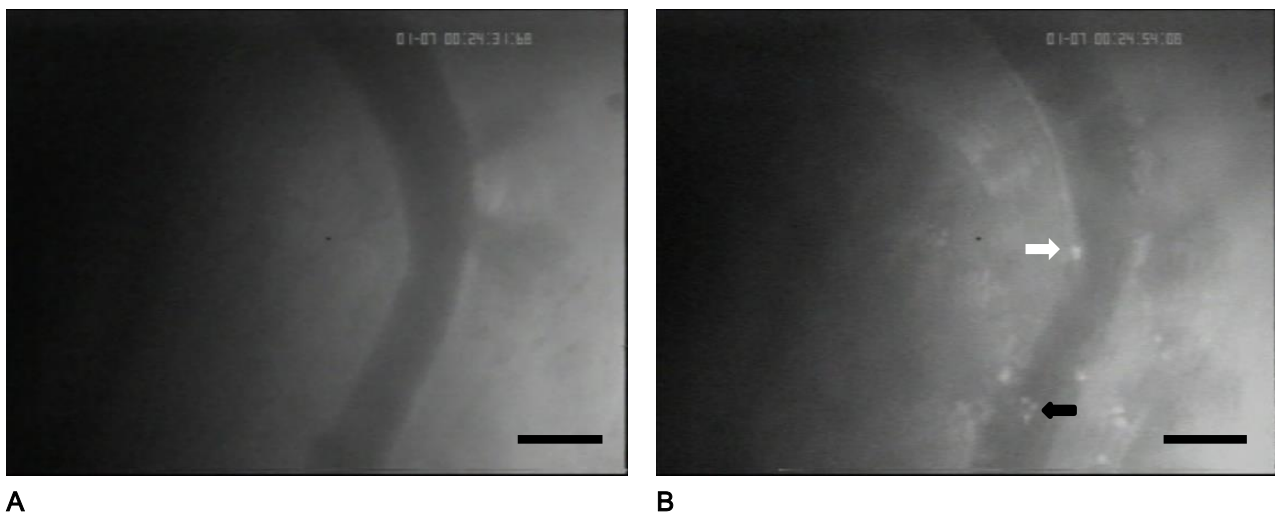


Abb. 3.1: Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie der rechtsventrikulären subepikardialen koronaren Mikrozirkulation 30 Minuten nach Reperfusion.

A: Venole unter grünem Licht ($\lambda = 560 \text{ nm}$), wodurch das Natrium-Fluoreszin angeregt wird. Zu erkennen ist, dass sich nach 30 Minuten bereits mehr Natrium-Floureszin außerhalb als innerhalb des Gefäßes befindet.

B: Venole unter blauem Licht ($\lambda = 510 \text{ nm}$), wodurch das 6G-Rhodamin angeregt wird und sich damit die korpuskulären Blutbestandteile darstellen. Mit einem weißen Pfeil sind adhärente Leukozyten gekennzeichnet. Adhärente Thrombozyten sind mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Der Maßstab bildet $60 \mu\text{m}$ ab.



C



D

Abb. 3.2: Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie der rechtsventrikulären, subepikardialen, koronaren Mikrozirkulation 90 Minuten nach Reperfusion.

C: Venole unter grünem Licht ($\lambda = 560 \text{ nm}$), wodurch das Natrium-Fluoreszin angeregt wird.

D: Venole unter blauem Licht ($\lambda = 510 \text{ nm}$), wodurch das 6G-Rhodamin angeregt wird und sich damit die korpuskulären Blutbestandteile darstellen. Mit einem weißen Pfeil sind adhärenente Leukozyten gekennzeichnet.

Der Maßstab bildet $60 \mu\text{m}$ ab.

3.1.1 Venuläre Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit der rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen betrug 30 Minuten nach Reperfusion $0,410 \pm 0,016$ mm/s. 90 Minuten nach Reperfusion betrug die Blutflussgeschwindigkeit $0,455 \pm 0,012$ mm/s. Der Unterschied der venulären Blutflussgeschwindigkeit in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

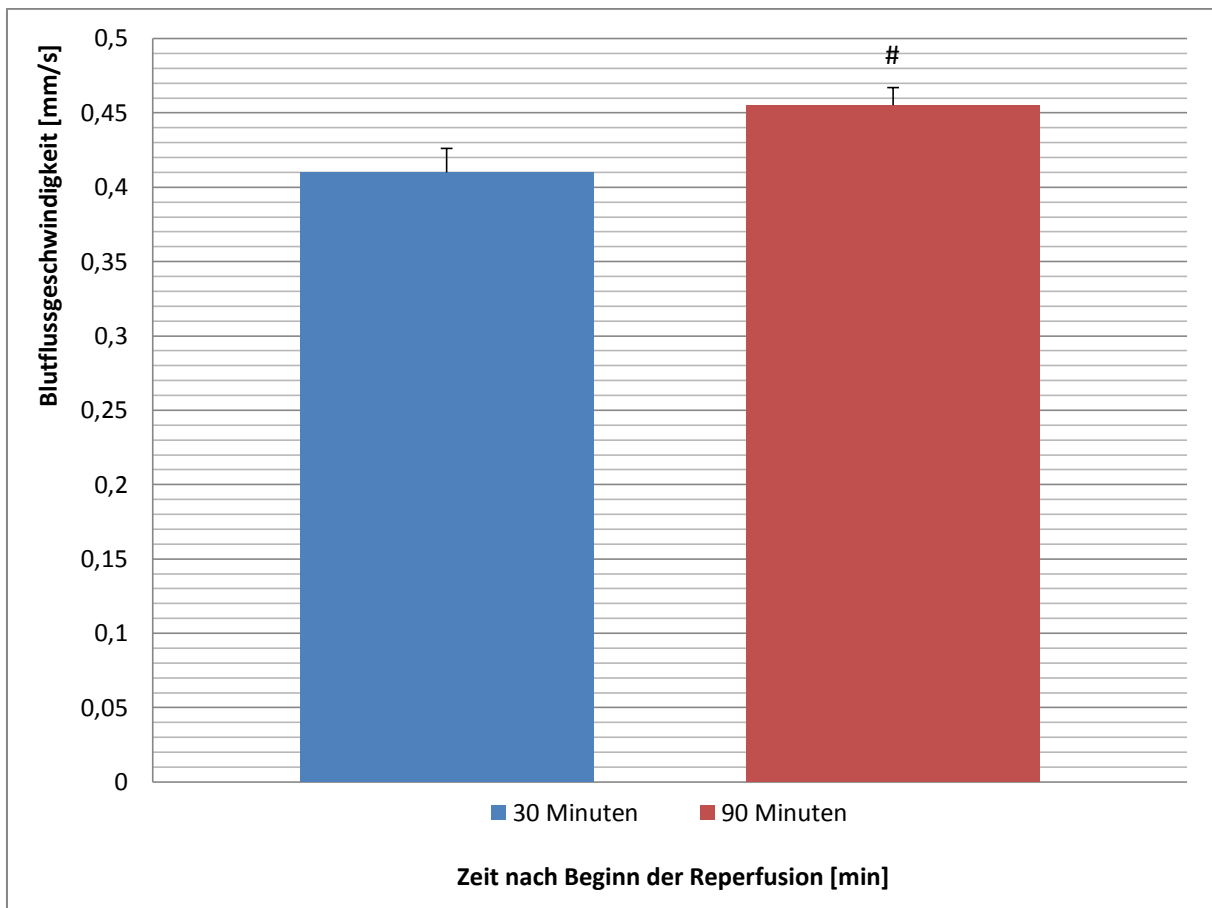


Abb. 3.3: Blutflussgeschwindigkeit in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen nach 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. 30 Minuten.

3.1.2 Volumetrischer Blutfluss

Der volumetrische Blutfluss in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen stieg während des Versuchszeitraumes deutlich an. Nach 30 Minuten Reperfusion betrug er $613,3 \pm 83,2$ pl/s und nach 90 Minuten Reperfusion $966,0 \pm 158,6$ pl/s. Der Unterschied der volumetrischen Blutflusses zwischen 30 und 90 Minuten nach Reperfusion war statistisch nicht signifikant ($p = 0,052$).

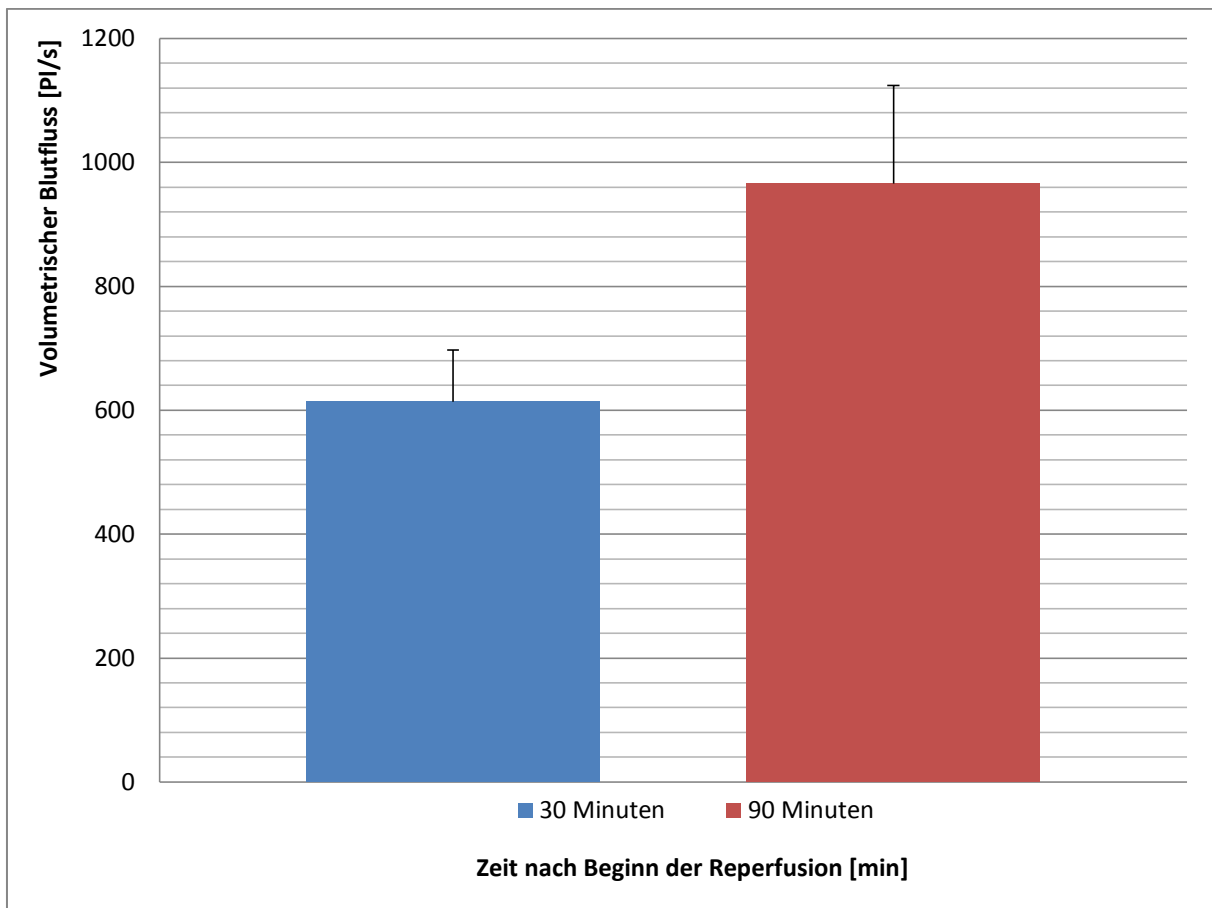


Abb. 3.4: Volumetrischer Blutfluss der rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.3 Leakage

Die Leakage, als Maß für die vaskuläre Permeabilität für Natrium-Fluoreszin, betrug nach 30 Minuten Reperfusion $127,8 \pm 3,3$ % und nach 90 Minuten Reperfusion $131,6 \pm 4,2$ %. Der Anstieg der Leakage zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch nicht signifikant ($p = 0,483$).

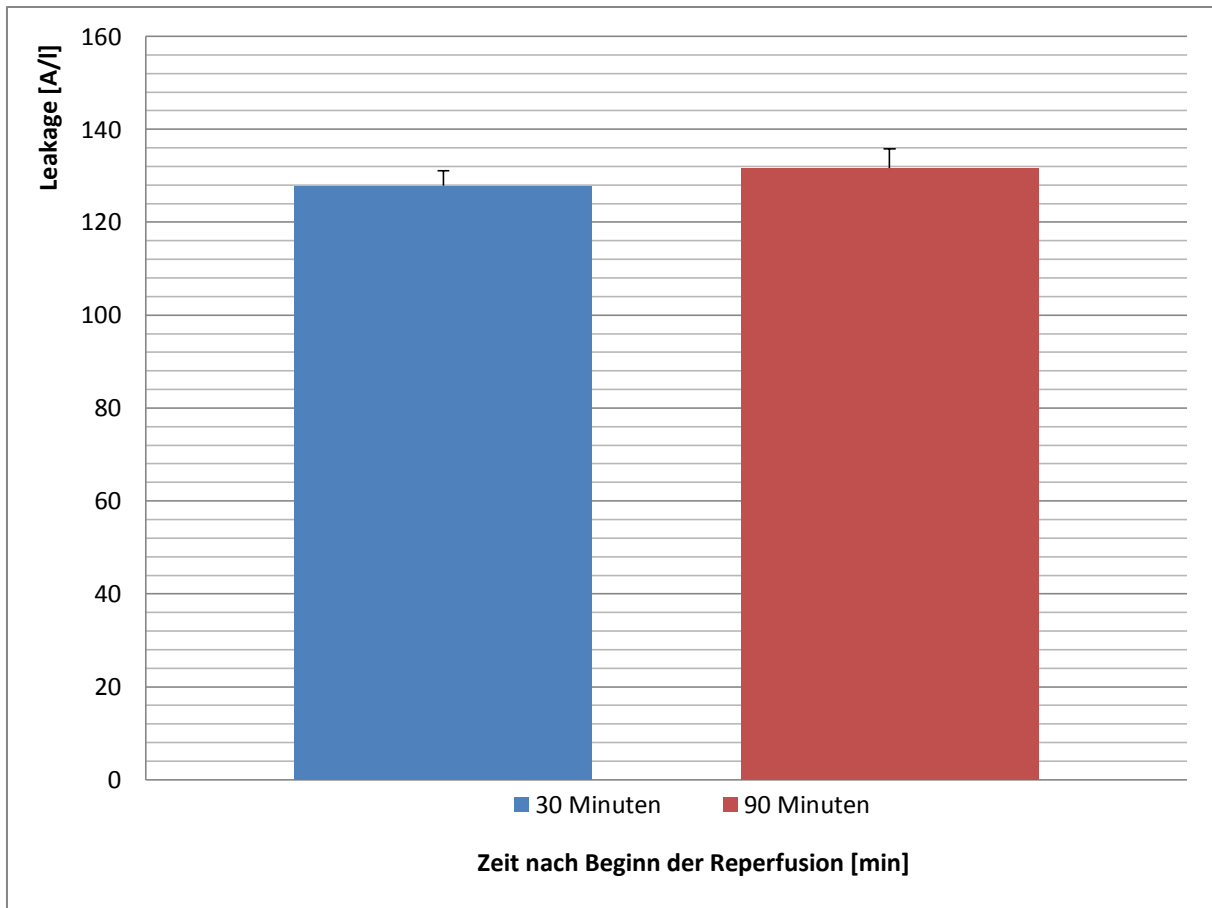


Abb. 3.5: Die Leakage der rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen für Natrium-Fluoreszin 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.4 Fest adhäreente Leukozyten

Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten pro mm² venulärer Endotheloberfläche stieg im Laufe der Reperfusion an. Sie betrug nach 30 Minuten Reperfusion $68,8 \pm 12,9$ /mm² und nach 90 Minuten Reperfusion $90,9 \pm 27,7$ /mm². Der Unterschied der fest adhärenenten Leukozyten zwischen 30 und 90 Minuten nach Reperfusion war statistisch nicht signifikant ($p = 0,454$).

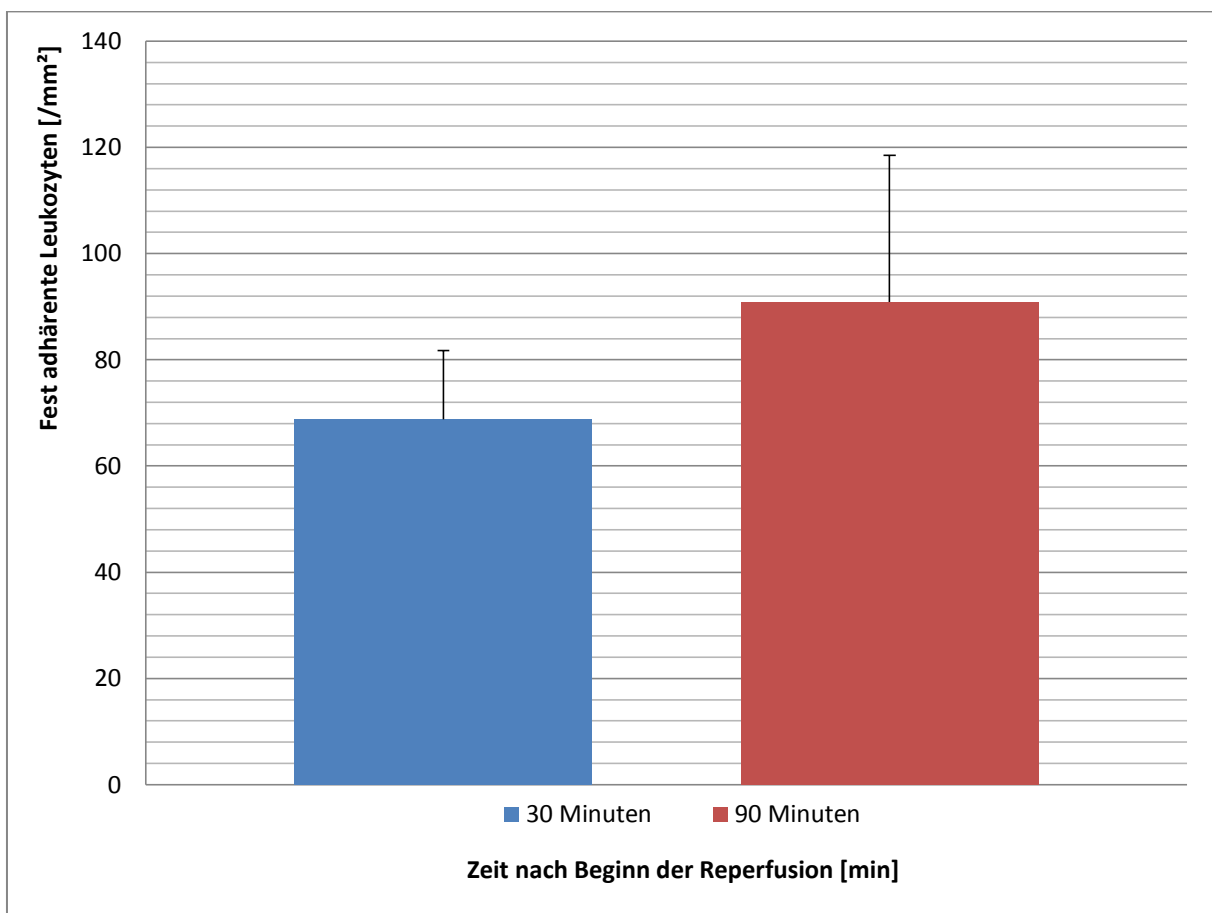


Abb. 3.6: Die Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten am venulären Gefäßendothel der rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.5 Rollende Leukozyten

Die Anzahl der rollenden Leukozyten betrug nach 30 Minuten Reperfusion $92,4 \pm 21,1$ pro Minute pro mm^2 Gefäßendothel und stieg nach 90 Minuten Reperfusion auf $140,7 \pm 56,3$ /min/ mm^2 . Der Unterschied der Anzahl der rollenden Leukozyten pro mm^2 venulärer Endotheloberfläche zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch nicht signifikant ($p = 0,869$).

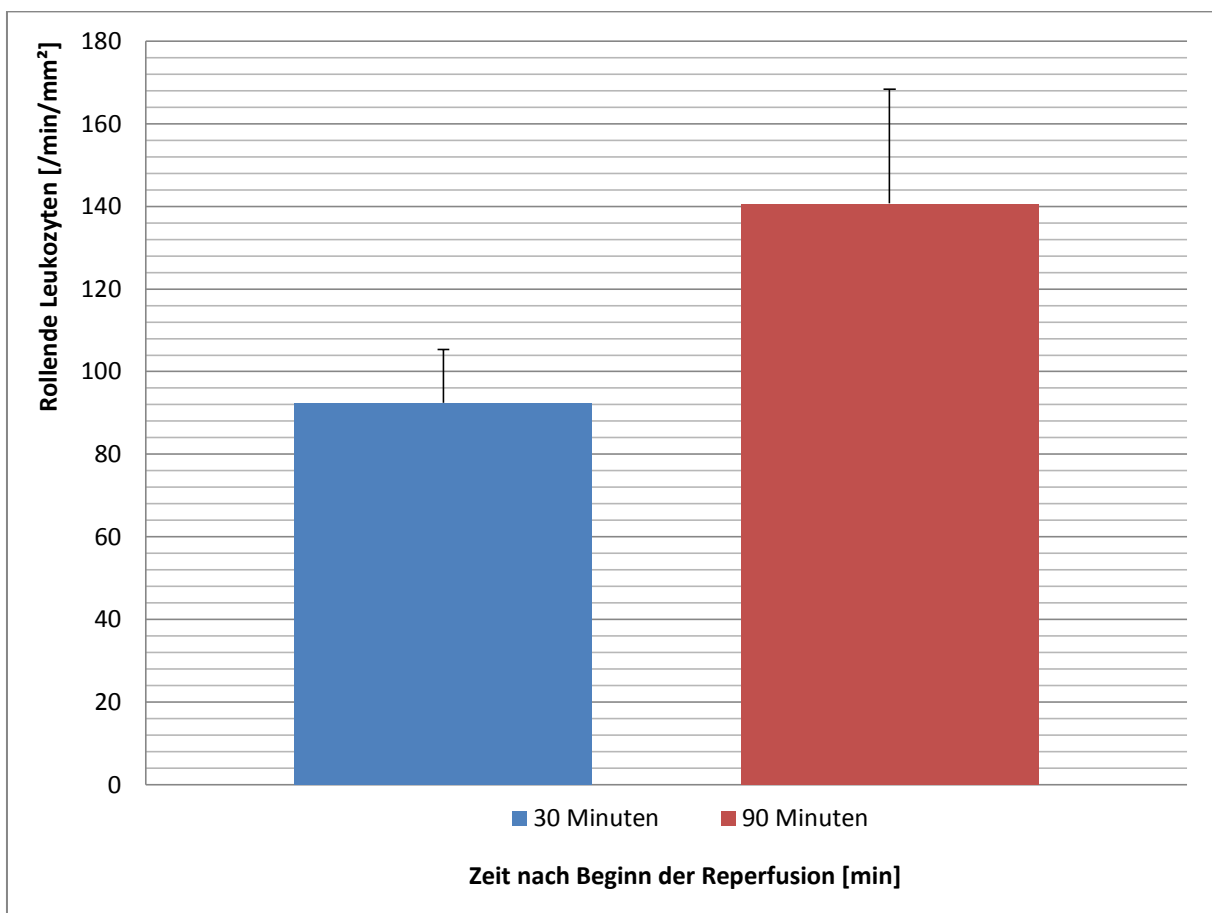


Abb. 3.7: Anzahl der rollenden Leukozyten am venulären Gefäßendothel der rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.6 Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten

Die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen betrug 30 Minuten nach Reperfusion $0,026 \pm 0,006$ mm/s. Nach 90 Minuten Reperfusion betrug die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten $0,032 \pm 0,008$ mm/s. Der Anstieg der Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch nicht signifikant ($p = 0,552$).

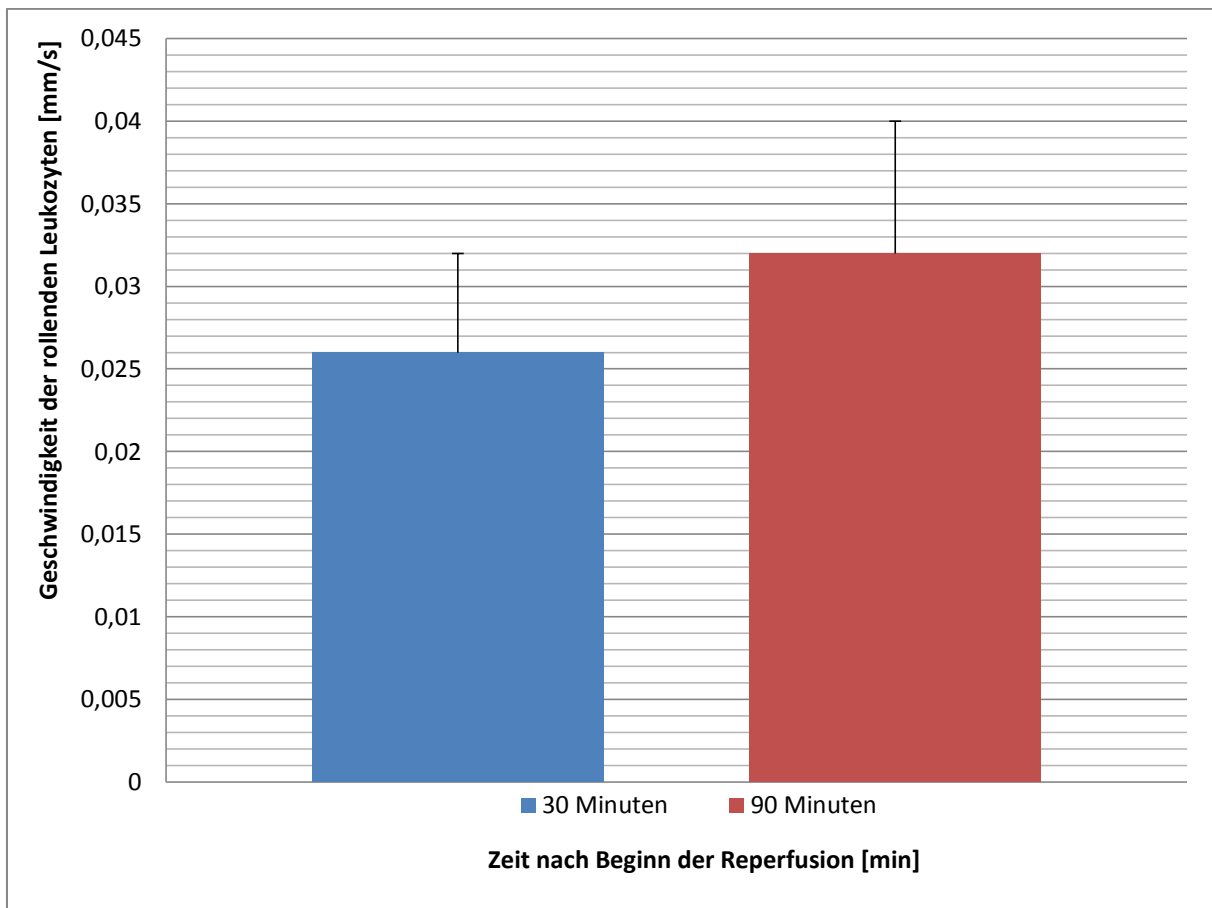


Abb. 3.8: Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.7 Fest adhärenente Thrombozyten

Die Anzahl der fest adhärenenten Thrombozyten pro mm² venulärer Endotheloberfläche betrug 30 Minuten nach Reperfusion $233,7 \pm 38,5$ /mm². Nach 90 Minuten Reperfusion fiel die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro mm² venulärer Endotheloberfläche auf $194,4 \pm 41,2$ /mm² ab. Der Unterschied der fest adhärenenten Thrombozyten zwischen 30 und 90 Minuten Reperfusion war statistisch nicht signifikant ($p = 0,448$).

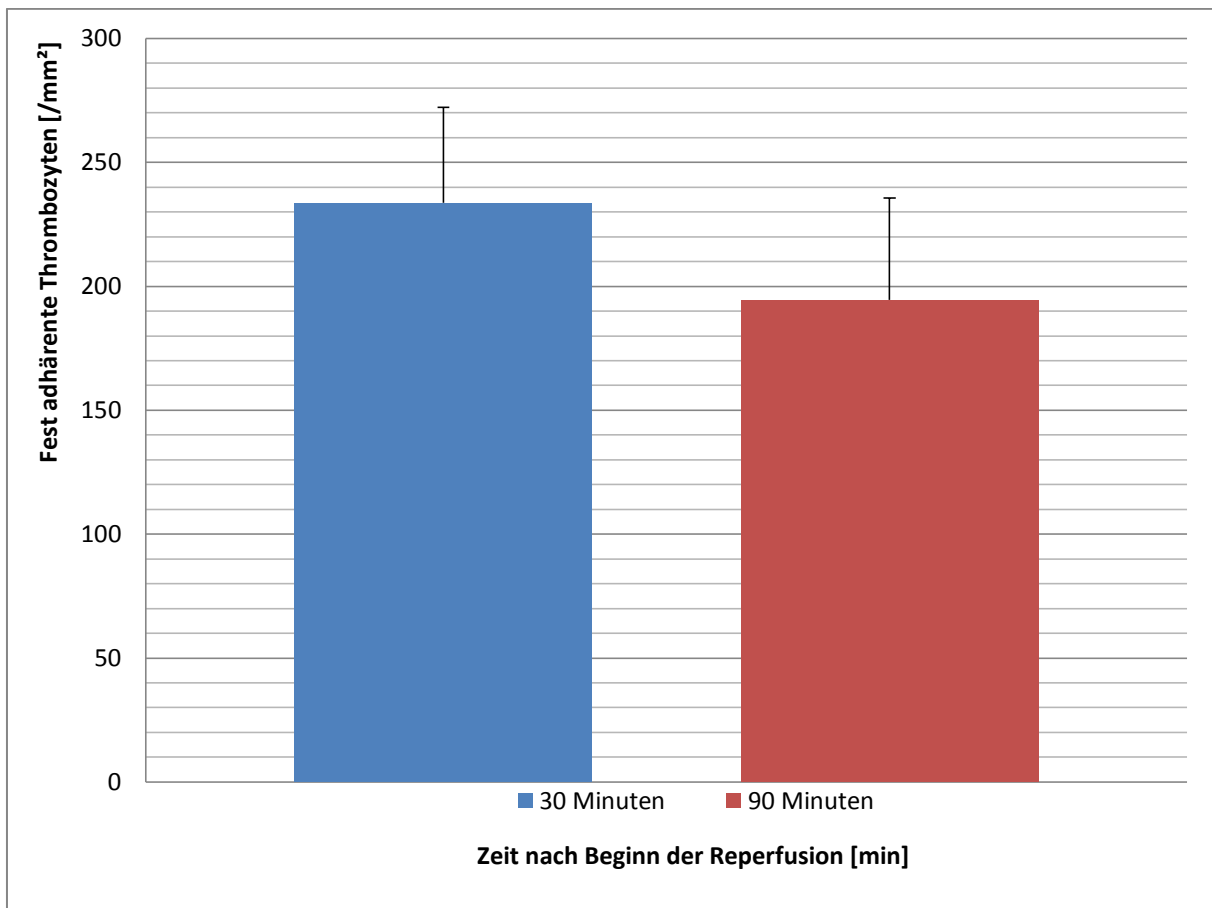


Abb. 3.9: Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro mm² venulärer Endotheloberfläche in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.8 Rollende Thrombozyten

Nach 30 Minuten Reperfusion betrug die Anzahl der rollenden Thrombozyten $293,9 \pm 97,1$ pro Minute pro mm^2 Gefäßendothel und verringerte sich nach 90 Minuten auf $110,4 \pm 49,7$ /min/ mm^2 . Der Unterschied der Anzahl der rollenden Thrombozyten pro mm^2 venulärer Endotheloberfläche in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch nicht signifikant ($p = 0,248$).

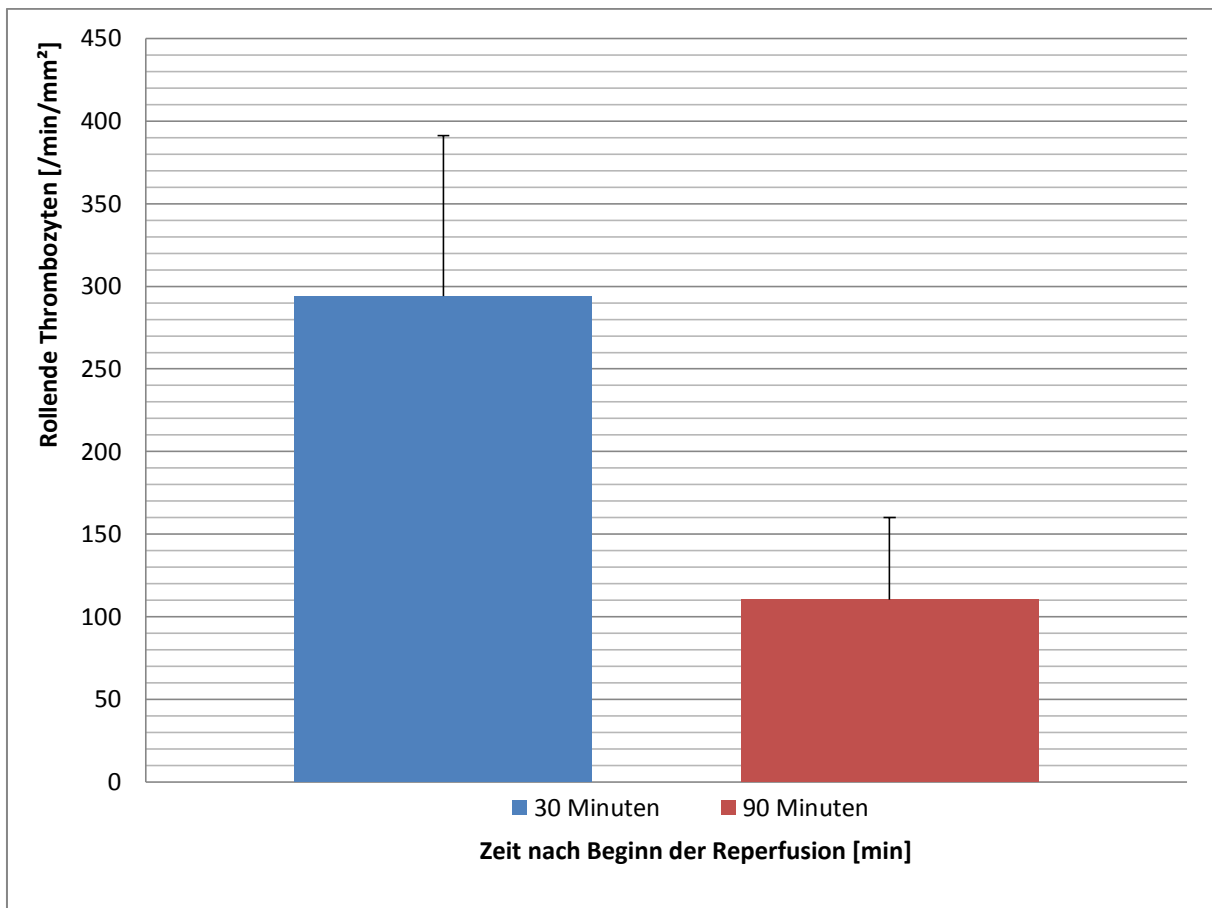


Abb. 3.10: Die Anzahl der rollenden Thrombozyten pro mm^2 venulärer Endotheloberfläche in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.9 Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten

Die Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen betrug nach 30 Minuten Reperfusion $0,026 \pm 0,006$ mm/s. Nach 90 Minuten Reperfusion betrug die Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten in den rechtsventrikulären postkapillären subepikardialen Koronarvenolen $0,037 \pm 0,016$ mm/s. Der Anstieg der Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten zwischen 30 und 90 Minuten war statistisch nicht signifikant ($p = 0,316$).

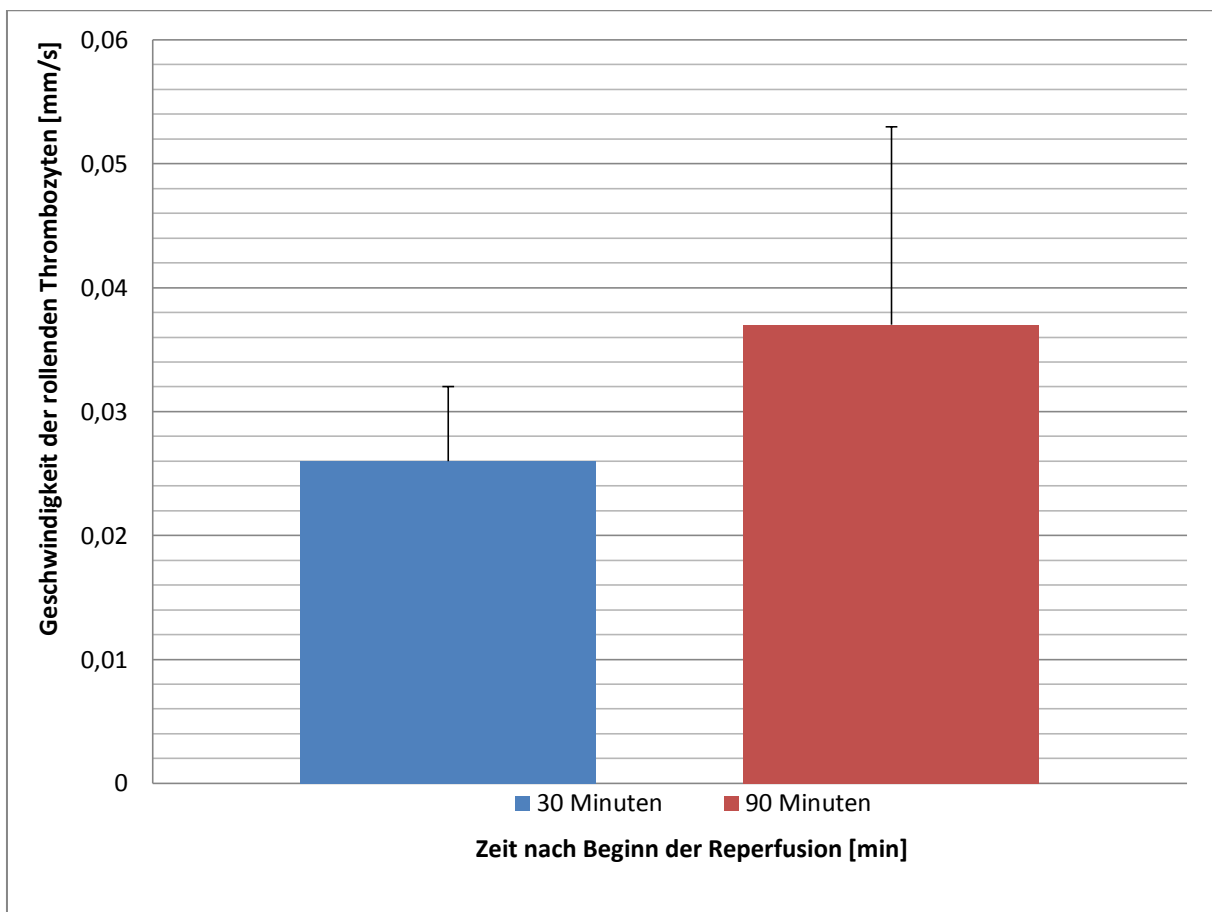


Abb. 3.11: Die Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten in den rechtsventrikulären, postkapillären, subepikardialen Koronarvenolen 30 Minuten (blaue Säule, $n=12$) und 90 Minuten (rote Säule, $n=10$) nach Reperfusion. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3.1.10 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der intravitalen
Multifluoreszenzmikroskopie

Parameter	30 Minuten	90 Minuten
Blutflussgeschwindigkeit [mm/s]	0,410 ± 0,016	0,455 ± 0,012 #
Volumetrischer Blutfluss [Pl/s]	613,4 ± 83,2	966,0 ± 158,6
Leakage [%]	127,8 ± 3,3	131,6 ± 4,2
Adhärente Leukozyten [n/mm ²]	68,8 ± 12,9	90,8 ± 27,7
Rollende Leukozyten [n/min/mm ²]	92,4 ± 21,1	140,7 ± 56,3
Geschwindigkeit rollende Leu [mm/s]	0,026 ± 0,006	0,032 ± 0,008
Adhärente Thrombozyten [n/mm ²]	233,7 ± 38,5	194,4 ± 41,2
Rollende Thrombozyten [n/min/mm ²]	293,9 ± 97,1	110,4 ± 49,7
Geschwindigkeit rollende Throm [mm/s]	0,026 ± 0,006	0,037 ± 0,016

Tab. 3.1.: Die Ergebnisse der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. 30 Minuten.

3.2 Klinische Chemie

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Blutanalysen der einzelnen Versuchsgruppen tabellarisch dargestellt (Tab. 3.2). Die unterschiedliche Probenanzahl (n) innerhalb einer Versuchsgruppe ist durch nicht verwertbare Blutproben durch die Klinische Chemie bedingt. Die Ausfallquote der Blutproben lag insgesamt bei 29,17%, wobei die Gründe für den Ausfall zu wenig Analysematerial (67,85% der Ausfälle) und geronnene Blutproben (32,15% der Ausfälle) waren.

Serum	Gruppe 1 (n=7)	Gruppe 2 (n=4)	Gruppe 3 (n=5)	Kontrolle (n=9)
K [mmol/l]	6,86 ± 0,79 #	5,0 ± 0,6	4,80 ± 1,42	4,7 ± 0,58
CK [U/l]	7528,43 ± 2468,74 #	17252,4 ± 10114,1 #	1968,6 ± 1207,9	428,22 ± 97,7
Trop I [ng/ml]	15,99 ± 9,97 #	17,37 ± 15,0 #	20,61 ± 11,65 #	<0,05
Myo [ng/ml]	7,5 ± 0,29 #	2,5 ± 0,5 #	3,0 ± 0,0 #	4,57 ± 0,3
Citrat	Gruppe 1 (n=6)	Gruppe 2 (n=4)	Gruppe 3 (n=5)	Kontrolle (n=6)
Quick [%]	126,67 ± 2,11	131,67 ± 4,41	151,0 ± 2,45 #	123,33 ± 4,7
INR	0,85 ± 0,02	0,833 ± 0,03	<0,8	0,87 ± 0,03
aPTT [sec]	<20	<18	<18	<18
aPTT Ratio	<0,7	<0,6	<0,6	<0,6
Fibr [mg/dl]	93,0 ± 20,6	135,67 ± 39,23	509 ± 37,1 #	121,5 ± 21,05
AT [%]	96,5 ± 2,67 #	91,75 ± 7,16 #	128,6 ± 6,41 #	107,0 ± 2,01
D-Dim [µg/ml]	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
EDTA	Gruppe 1 (n=5)	Gruppe 2 (n=3)	Gruppe 3 (n=5)	Kontrolle (n=8)
Leu [G/l]	3,56 ± 1,1	3,7 ± 0,06 #	8,68 ± 1,39 #	5,85 ± 0,66
Ery [T/l]	9,624 ± 0,29 #	8,39 ± 0,29	7,06 ± 0,24 #	8,43 ± 0,31
Hb [g/dl]	16,56 ± 0,51 #	14,67 ± 0,53	11,84 ± 0,31 #	14,15 ± 0,37
Throm [G/l]	523,4 ± 39,18	586,67 ± 57,95	497,6 ± 82,87	559,75 ± 18,3

Tab. 3.2: Die Ergebnisse der Klinischen Chemie. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Gruppe 1: Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation. Gruppe 2: Versuche zur hyperakuten Abstoßung. Gruppe 3: Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung. Kontrollgruppe: Blut naiver Lewis Ratten.

3.2.1 Klinische Chemie Gruppe 1 (Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation)

Der Serumspiegel des Kaliums der Ratten der Gruppe 1 war mit $6,86 \pm 0,79$ mmol/l signifikant gegenüber der Ratten der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Der Serumspiegel Kreatinkinase (CK) der Ratten der Gruppe 1 nach 90-minütiger Intravitalmikroskopie betrug $7528,43 \pm 2468,74$ U/l und war somit ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Auch das Troponin I mit $15,99 \pm 9,97$ ng/ml und das Myoglobin mit $7,5 \pm 0,29$ ng/ml als weitere Myokardmarker waren signifikant gegenüber den Werten der Kontrollen erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

In der Gerinnungsanalyse unterschied sich der Wert des Antithrombins der Ratten der Gruppe 1 mit $96,5 \pm 2,67$ % von dem der Kontrollgruppe und war folglich signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

Im der Blutbildanalyse fielen die signifikant erhöhten Erythrozyten mit $9,624 \pm 0,29$ T/l und der signifikant erhöhte Hämoglobinwert von $16,56 \pm 0,51$ g/dl der Ratten der Gruppe 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

3.2.2 Klinische Chemie Gruppe 2 (Versuche zur hyperakuten Abstoßung)

In den Blutanalysen der Ratten der Gruppe 2, die zuvor mit Hamsterblut sensibilisiert wurden und das Hamsterherz hyperakut abgestoßen haben, war der Serumspiegel der Kreatinkinase mit $17252,4 \pm 10114,1$ U/l und das Troponin I mit $17,37 \pm 15,0$ ng/ml signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Das Myoglobin der Ratten der Gruppe 2 war mit $2,5 \pm 0,5$ ng/ml signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

Die Gerinnungsanalyse ergab einen signifikant erniedrigten Antithrombinwert von $91,75 \pm 7,16$ % der Ratten der Gruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

In der Blutbildanalyse fiel eine signifikant erniedrigte Leukozytenzahl von $3,7 \pm 0,06$ G/l der Ratten der Gruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

3.2.3 Klinische Chemie Gruppe 3 (Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung)

In den Blutanalysen der Ratten der chronischen Versuche fiel das signifikant erhöhte Troponin I mit $20,61 \pm 11,65$ ng/ml und das signifikant erniedrigte Myoglobin mit $7,5 \pm 0,29$ ng/ml gegenüber der Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

Die Gerinnungsanalyse der Ratten der Gruppe 3 ergab einen signifikant erhöhten Quick-Wert von $151,0 \pm 2,45$ %, sowie einen signifikant erhöhten Wert an Fibrinogen von $509 \pm 37,1$ mg/dl und Antithrombin von $128,6 \pm 6,41$ % gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

Die Blutbildanalyse der Ratten in den chronischen Versuchen ergab eine signifikant erniedrigte Erythrozytenzahl mit $7,06 \pm 0,24$ T/l, welche mit einem signifikant erniedrigten Hämoglobin von $11,84 \pm 0,31$ g/dl gegenüber der Kontrollgruppe einherging ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Die Anzahl der Leukozyten war mit $8,68 \pm 1,39$ G/l hingegen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

3.3 Histologien

Die HE-Schnitte aller transplantierten Hamsterherzen aus den drei Versuchsgruppen wurden jeweils mittels des in 2.6.2 genannten Scores semiquantitativ ausgewertet. Als Kontrollgruppe dienten die naiven Herzen der Lewis-Ratten.

	Gruppe 1 (n=12)	Gruppe 2 (n=5)	Gruppe 3 (n=3)	Kontrolle (n=18)
Nekrosen	1,21 ± 0,26 #	1,7 ± 0,12 #	3,0 ± 0,0 #	0,17 ± 0,06
Mononukl. Z.	0,21 ± 0,07	0,7 ± 0,12 #	1,83 ± 0,17 #	0,08 ± 0,06
Hämorrh.	0,63 ± 0,19 #	1,2 ± 0,26 #	3,0 ± 0,0 #	0,06 ± 0,04
Gefäßverschl.	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,29	0,5 ± 0,29	0,00 ± 0,00

Tab. 3.3: Ergebnisse der histologischen Auswertung anhand des oben genannten Score-Systems (Tab. 2.2). Es wurden die jeweiligen Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. # p < 0,05 vs. Kontrolle.

Gruppe 1: Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation.

Gruppe 2: Versuche zur hyperakuten Abstoßung.

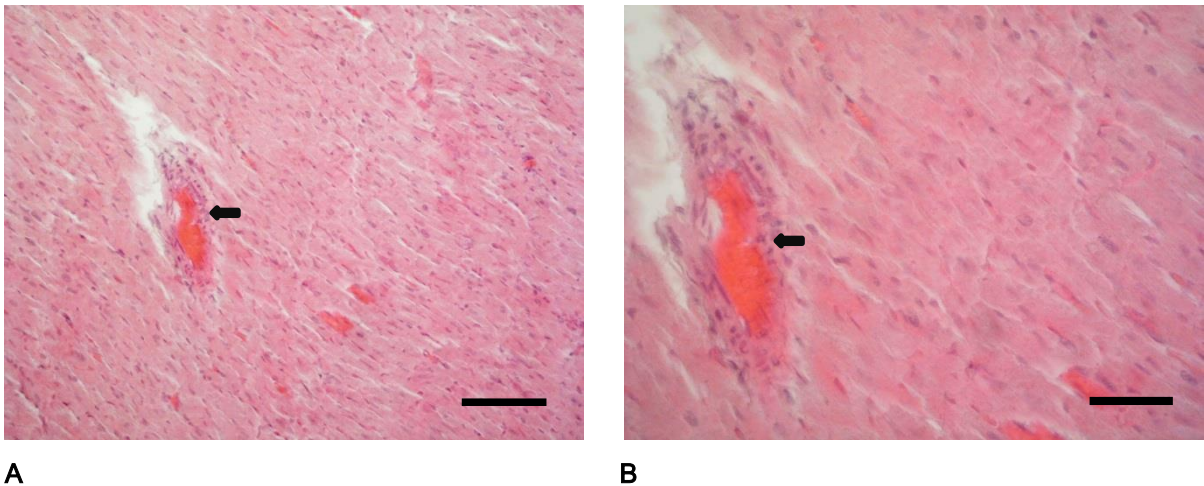
Gruppe 3: Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung.

Kontrolle: Herzen naiver Lewis-Ratten.

3.3.1 Kontrollen

In Abbildung 3.11 ist exemplarisch ein HE-Schnitt eines naiven Herzens einer Lewis-Ratte dargestellt. Bei der verblindeten Auswertung durch zwei unabhängige Untersucher betrug der Mittelwert des Scores (vgl. Tab. 2.2) hinsichtlich der

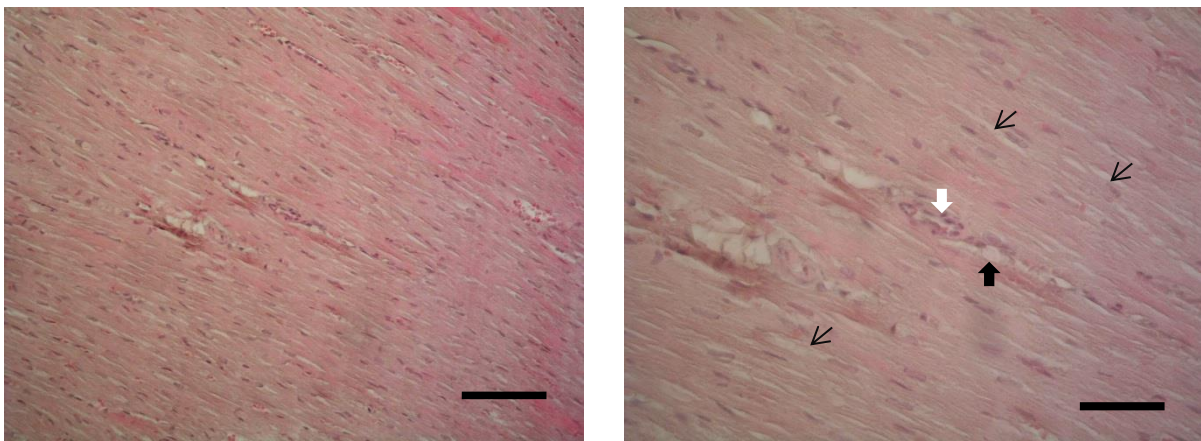
- Nekrosen: $0,17 \pm 0,06$
- mononukleären Zellen: $0,08 \pm 0,06$
- Hämorrhagien: $0,06 \pm 0,04$
- Gefäßverschlüsse: $0,00 \pm 0,00$.



A **B**
Abb. 3.12: exemplarischer HE-Schnitt eines naiven Ratten-Herzens. Der Massstab stellt 200 μm (A) bzw. 100 μm (B) dar. Zu sehen ist ein Schnitt durch weitestgehend intaktes Myokard einer Lewis-Ratte. Bei dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Gefäß handelt es sich um eine Arteriole.

3.3.2 Histologieschnitte der Gruppe 1 (Versuche zur akuten Beurteilung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation)

Der Histologiescore der transplantierten Hamsterherzen, die unmittelbar nach der Intravitalmikroskopie entnommen wurden, war hinsichtlich der Nekosen mit $1,21 \pm 0,26$ und der Hämorrhagien mit $0,63 \pm 0,19$ signifikant gegenüber dem Histologiescore der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Bezüglich der mononukleären Zellen und der Gefäßverschlüssen konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,201$ bzw. $P = 0,983$ vs. Kontrolle).



A

B

Abb. 3.13: HE-Schnitt eines Hamsterherzens nach 90-minütiger IVM. (A, B) Zu sehen ist ein Schnitt durch ein überwiegend intaktes Myokard mit längs- und quergeschnittenen Herzmuskelzellen.

(B) Zu erkennen sind teilweise vergrößerte intersitielle Räume (dünne schwarze Pfeile) als möglicher Ausdruck eines Ödems sowie eine Arteriole (dicker weißer Pfeil) und Venolen (dicker schwarzer Pfeil).

Der Massstab stellt 200 μm (A) bzw. 100 μm (B) dar.

3.3.3 Histologieschnitte Gruppe 2 (Versuche zur hyperakuten Abstoßung)

Der Histologiescore der hyperakut abgestoßenen Hamsterherzen der Gruppe 2 war bezüglich der Nekrosen mit $1,7 \pm 0,12$, der mononukleären Zellen mit $0,7 \pm 0,12$ und der Hämorrhagien mit $1,2 \pm 0,26$ signifikant gegenüber dem Histologiescore der Kontrollen erhöht ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Hinsichtlich der Gefäßverschlüsse bei der Hamsterherzen der Gruppe 2 konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollhistologien festgestellt werden ($p = 0,185$ vs. Kontrolle).

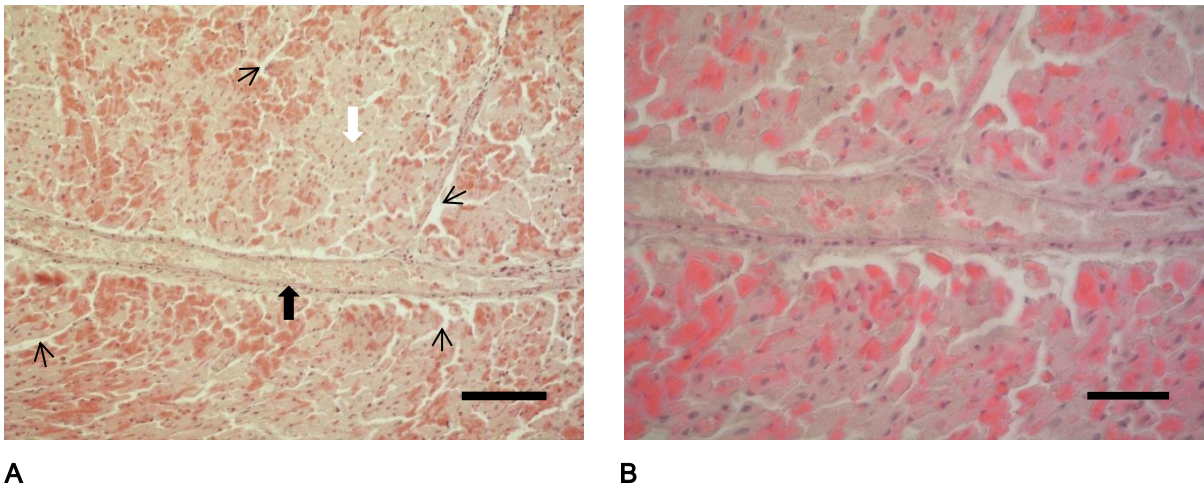
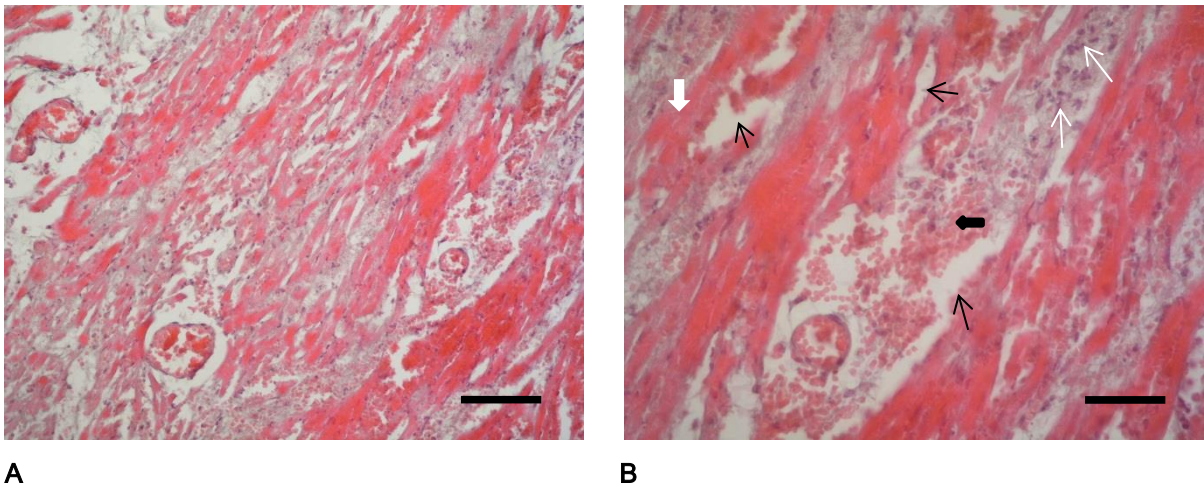


Abb. 3.14: HE-Schnitte eines hyperakut abgestoßenen Hamsterherzens. (A) Zu sehen ist reichlich nekrotisches Myokard (dicker weißer Pfeil), eine thrombosierte Arteriole im Längsschnitt (dicker schwarzer Pfeil), sowie deutlich vergrößerte interstitielle Räume (dünne schwarze Pfeile). Der Massstab stellt 200 μm (A) bzw. 100 μm (B) dar.

3.3.4 Histologieschnitte Gruppe 3 (Chronische Versuche zur xenogenen Abstoßung)

Der Histologiescore der Hamsterherzen aus den chronischen Versuchen der Gruppe 3 unterschied sich hinsichtlich der Nekrosen mit $3,0 \pm 0,0$, der mononukleären Zellen mit $1,83 \pm 0,17$ und der Hämorrhagien mit $3,0 \pm 0,0$ signifikant vom Histologiescore der Kontrollherzen ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Bezüglich der Gefäßverschlüsse konnte kein signifikanter Unterschied des Histologiescores der Gruppe 3 zu den Kontrollhistologien gefunden werden ($p = 0,074$ vs. Kontrolle).



A **B**
Abb. 3.15: HE-Schnitt eines akut abgestoßenen Hamsterherzens nach chronischem Versuch ca. 3 Tage nach der xenogenen Herztransplantation. (B) Zu erkennen sind großflächige nekrotische Areale (dicker weißer Pfeil), Hämorrhagien (dicker schwarzer Pfeil), stark verbreiterte interstitielle Räume (dünne schwarze Pfeile) und Infiltrate mononukleärer Zellen (dünne weiße Pfeile). Der Massstab stellt 200 μm (A) bzw. 100 μm (B) dar.

3.4 Überlebenszeit der Hamsterherz-Grafts der Versuchsgruppen 2 und 3

Die mittlere Überlebenszeit (Zeit bis keine Herzaktion des Grafts mehr palpiert werden konnte) der Hamsterherz-Grafts der Versuchsgruppe 3 in naiven Lewis-Ratten betrug $3,2 \pm 0,2$ Tage.

Die mittlere Überlebenszeit der Hamsterherzen in den zuvor mit Hamsterblut sensibilisierten Lewis-Ratten der Versuchsgruppe 2 betrug dagegen nur $14,8 \pm 2,8$ Sekunden. Gelegentlich kam es initial nicht einmal zu einem regelmäßigen Herzrhythmus.

4. Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Tiermodell

Das verwendete Hamster-Ratte-Modell zur Untersuchung der xenogenen Abstoßungsreaktion ist ein bereits gut etabliertes Versuchmodell in der Xenotransplantationsforschung. Das Kleintiermodell bietet gegenüber dem Großtiermodell (z.B. Schwein-Pavian) eine Reihe von Vorteilen. Zum einen ist es vergleichsweise kostengünstig und die Haltung der Tiere ist nicht so aufwendig (Zhang et al., 2000). Zum anderen ist es durch seine bereits häufige Anwendung in Bezug auf die Vorgänge der xenogenen Abstoßungsreaktion relativ gut erforscht. So konnten in zahlreichen Studien die Existenz der akut vaskulären Abstoßungsreaktion, sowie die histopathologischen Merkmale und die beteiligten Faktoren, in diesem Modell nachgewiesen werden (Hasan et al., 1992; Nielsen et al., 1993). Die mikrozirkulatorische Dysfunktion nach xenogener Herztransplantation direkt im Myokard wurde mittels Intravitalmikroskopie im Hamster-Ratte-Modell bisher noch nicht untersucht.

Auch zur Durchführung der multifuoreszenz Intravitalmikroskopie am schlagenden Herzen bietet sich dieses Modell hervorragend an, da zum einen die Größe der Versuchstiere die Untersuchung unter dem Mikroskop zulässt ohne dass hierfür größere Geräte notwendig sind und zum anderen so große Teile des rechtsventrikulären Myokards in einem relativen kurzen Zeitraum untersucht werden können. Die multifuoreszenz Intravitalmikroskopie ist eine bereits etablierte Methode zur Bestimmung der mikrozirkulatorischen Vorgänge sowie der Zell-Endothel-Interaktion im Kleintiermodell (Schramm et al., 2007).

Ein weiterer Vorteil dieses Modells hinsichtlich der Erforschung der xenogenen Abstoßungsreaktion ist, dass durch die Injektion von Hamsterblut sieben bis zehn Tage vor der eigentlichen Herztransplantation und damit der Stimulation zur Bildung von Xeno-Antikörpern das Hamster-Ratte-Modell einfach von einem konkordanten in ein diskordantes Modell umgewandelt werden kann (Schraa et al., 2002). Das konkordante Modell bietet sich durch die Abwesenheit großer Mengen präformierter Xeno-Antikörpern zur Untersuchung der akut vaskulären Abstoßungsreaktion an. Das diskordante Modell bietet dagegen, nach der Induktion zur Bildung von Xeno-Antikörpern ein Modell zur Erforschung der hyperakuten Abstoßungsreaktion (Zhang et al., 2000).

Ein Kritikpunkt an diesem Modell könnte die fragliche Übertragbarkeit auf den Menschen, bzw. die letztendlich angestrebte Transplantation zwischen Schwein und Mensch sein. Das Hauptproblem bei der Transplantation von Schweineherzen in einen Menschen war vor der Ära der transgenen Schweine die hyperakute Abstoßungsreaktion, welche hauptsächlich durch präformierte natürliche

Antikörper verursacht wird. Inwieweit die hyperakute Abstoßungsreaktion durch präformierte natürliche Antikörper mit der hyperakuten Abstoßungsreaktion durch induzierte Xeno-Antikörper vergleichbar ist, ist nicht bekannt und die bisher erhobenen Daten bezüglich der Dauer bis zum Transplantatversagen und der Höhe der Antikörpertiter sind heterogen (Hardy et al., 1982; Knechtle et al., 1986). Die Abstoßungsreaktion durch PNAK scheint vor allem durch IgM und den klassischen Weg der Komplementaktivierung charakterisiert zu sein, mit hohen Titern an IgM und C3. Die Zeit bis zur völligen Transplantatabstoßung wird meist mit 20 ± 10 Minuten angegeben (Leventhal et al., 1993; Miyagawa et al., 1988). Die Zeit bis zur vollständigen Abstoßung des Transplantats durch induzierte Xeno-Antikörper wird meist in einem ähnlichen Zeitraum angegeben, allerdings werden hier auch hohe Titer an IgG gemessen (Zhong et al., 1998). Jedoch werden je nach Individuum unterschiedliche Verhältnisse an IgM und IgG gemessen (Roos & Daha, 2002), so dass die Pathologie der antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion durch präformierte oder induzierte Antikörper vergleichbar sein dürfte, worauf auch die histopathologischen Merkmale in verschiedenen Studien schließen lassen (Steinbrüchel et al., 1992).

Ein weiterer Kritikpunkt an diesem Modell könnte außerdem die Notwendigkeit von mikrochirurgischen Techniken zur Transplantation der Hamsterherzen sein, welche allerdings durch die Verwendung der Cuff-Technik vereinfacht wurde und durch diverse Arbeitsgruppen schon gut etabliert ist (siehe 4.1.2).

4.1.2 Heterotope Herztransplantation

Die Operationstechnik der Herztransplantation wurde erstmals von Heron (Heron, 1971) beschrieben und von Schramm (Schramm et al., 2006) abgewandelt. Das operative Verfahren ist somit von verschiedenen Forschungsgruppen vielfach angewendet worden und gut etabliert.

Anstatt das Spenderherz abdominell per End-zu-Seit Anastomose mit einer fortlaufenden Naht an die Empfängeraorta anzuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Herz über eine End-zu-End Anastomose an die Halsgefäße des Empfängertiers transplantiert. Dies geht mit einer Reihe von Vorteilen einher:

Zum einen ist das Operationsrisiko für das Empfängertier geringer, da die Bauchhöhle nicht eröffnet werden muss und so das operative Trauma minimiert wird. Weitere Vorteile der Transplantation des Herzens in die Halsregion des Empfängers sind, dass dadurch das Herz besser zugänglich zur Intravitalmikroskopie und zur Überwachung der Transplantatfunktion ist. Das Herz liegt bei der hier verwendeten Methode frei und stabil am lateralen Hals, ohne dass störende Organe (z.B. Darm) oder störendes Gewebe die Intravitalmikroskopie erschweren (Schramm et al., 2006). Auch bei chronischen Versuchen nach Verschluss des Operationsgebiets kann die Organfunktion sehr einfach durch Inspektion und Palpation überwacht werden, da das Transplantat nur von der Haut des

Empfängers bedeckt ist, während bei der abdominalen Transplantation außerdem Muskelschichten und ggf. Teile des Darms vor dem Transplantat liegen. Zudem ist das Herz in der Halsregion besser zugänglich für eventuell weitere Untersuchungen, wie der Ableitung eines EKGs (Schramm et al., 2006). Bei der Untersuchung immunologischer Vorgänge nach der Transplantation des Herzens in den Bauchbereich sollte außerdem beachtet werden, dass in der Peritonealhöhle eine Vielzahl an immunologisch aktiven Zellen, wie Makrophagen oder Mastzellen, vorhanden sind, welche eventuell mit den immunologischen Prozessen der Abstoßung interferieren könnten (Schramm et al., 2006). Dieses Problem wird durch die Transplantation des Spenderherzens an die Halsgefäße ebenfalls umgangen.

Eine weitere Option wäre die orthotope, also intrathorakale Implantation des Spenderherzens. Dies käme der geplanten späteren klinischen Anwendung wahrscheinlich am nächsten. Der große Nachteil dieses Modells ist allerdings das ebenfalls große operative Trauma. Dazu kommen die Notwendigkeit der invasiven Beatmung nach Thorakotomie und die Notwendigkeit der extrakorporalen Zirkulation. Auch wäre das Empfängertier vital von dem Transplantat abhängig, was wiederum unter anderem Probleme bei der Untersuchung, z.B. durch störende Lungenbewegungen bei der Intravitalmikroskopie, und ein höheres operatives Risiko bedeuten würde. Da das Spenderherz bei dem von uns verwendeten Modell retrograd über den Aortenbogen gegen die geschlossene Aortenklappe mit Blut versorgt wird, erhält der linke Ventrikel praktisch keine Füllung und nur der rechte Ventrikel erhält über den Koronarsinus während der Diastole eine marginale Füllung. Somit arbeitet quasi nur der rechte Ventrikel, was daran zu erkennen ist, dass bei chronischen Versuchen der linke Ventrikel deutlich atrophiert (Heron, 1971). Aufgrund der geringen diastolischen Füllung des rechten Ventrikels ist auch der systolische Auswurf gering, was zu einer stabileren Oberfläche im Vergleich zu einem normal arbeitenden Herzen führt und die Bewegungsartefakte bei der Intravitalmikroskopie reduziert.

Es ist außerdem empfehlenswert Studien zu Abstoßungsreaktionen und Mikrozirkulation an in vivo Modellen zu untersuchen. Ex vivo oder in vitro Modelle können das komplexe Zusammenspiel der einzelnen immunologischen und mikrozirkulatorischen Komponenten des Gesamtorganismus nur simulieren (Menger et al., 2003). Dies ist aber v.a. bei so vielschichtigen und noch wenig erforschten Vorgängen wie der xenogenen Abstoßungsreaktion äußerst schwierig. Aus diesem Grund sind in vivo Modelle ex vivo Modellen z.B. die Perfusion von Schweineherzen mit Humanblut bei der Erforschung komplexer Abstoßungsreaktionen überlegen.

Zur Anastomosierung der Spender- mit den Empfängergefäßen verwendeten wir die erstmals von Matsuura (Matsuura et al., 1991) beschriebene Cuff-Technik. Der größte Vorteil dieser Technik gegenüber der Gefäßnaht ist die Minimierung der Ischämiezeit, da die Cuffs bereits während der Explantation des Spenderherzens an die Halsgefäße des Empfängers angebracht werden können und

somit zur Anastomosierung nur noch eine Ligatur der Gefäße über dem Cuff notwendig ist. Diese Technik ist außerdem im Vergleich zur Gefäßnaht einfacher zu erlernen und geht mit weniger Komplikationen wie Blutungen und Okklusionen an der Anastomose einher (Xiu et al., 2001). Zwar ist bei dieser Operationstechnik nur eine End-zu-End Anastomosierung möglich, während durch eine Naht auch eine End-zu-Seit Anastomosierung möglich ist, so dass keine direkte Anastomose zwischen den Spendergefäßen und der Aorta abdominalis bzw. V. cava inferior möglich ist. Sollte eine Transplantation des Spenderherzens in den Bauchraum aber dennoch gewünscht sein, kann dies über eine einseitige Nephrektomie und eine End-zu-End Anastomose zwischen den Spendergefäßen und den Nierengefäßen des Empfängers erreicht werden (Schramm et al., 2006).

Als Perfusions- und Konservierungslösung des Spenderherzens während der Ischämiezeit benutzten wir eine Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) nach Bretschneider. Spezielle Konservierungslösungen wie die HTK-Lösung sind den häufig verwendeten NaCl- oder Ringerlösungen in Sachen Organprotektion während der Ischämiezeit überlegen (Michel et al., 2002). Auch so konnten wir den Ischämieschaden möglichst gering halten. Außerdem wurde mit Hilfe dieser Lösung das Blut des Spenders aus dem Herzen gewaschen, so dass eine Stase in der Mikrozirkulation verhindert werden konnte und das Risiko eines „no-reflow“-Phänomens während der Reperfusion in den Kapillaren verringert wurde. Zudem wurden auch sämtliche Spender-Leukozyten entfernt, was die Gefahr einer Graft-versus-Host-Reaktion ebenfalls minimiert (Schramm et al., 2007). Eine Störvariable könnte aber der eventuelle Einfluss der Anästhetika und des Operationstraumas auf die koronare Mikrozirkulation sein (Lindbom et al., 1982). Um zumindest das Operationstrauma so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Präparation des zu untersuchenden Gewebes sehr schonend unter dem Mikroskop mit mikrochirurgischem Operationsinstrumentarium.

4.1.3 Intravitalmikroskopie

Das angewendete Modell erlaubt mittels multifluoreszenz Intravitalmikroskopie die quantitative und qualitative Analyse der Mikrozirkulation der subepikardialen Gefäße des rechten Ventrikels. Hierzu zählen die zuführenden Arteriolen, die nutritiven Kapillaren und die postkapillären Venolen.

Die Technik der multifluoreszenz Intravitalmikroskopie und deren Auswertung wurde schon vielfach für ähnliche Fragestellungen angewandt und ist zur Analyse der Mikrozirkulation in vielen Organpräparationen inzwischen gut etabliert (Menger & Lehr, 1993; Schramm et al., 2007). Hauptvorteil der multifluoreszenz Intravitalmikroskopie ist gegenüber anderen Verfahren zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation wie der Laser-Doppler-Flowmetrie oder der Mikrosphärentechnik, dass mit Hilfe der Intravitalmikroskopie direkte Aussagen über die Mikrozirkulation durch deren Visualisierung getroffen werden können, während andere Methoden nur indirekte Schlüsse zulassen

(Arvidsson et al., 1988; Hendel et al., 1983). So können die einzelnen Segmente der Mikrozirkulation getrennt voneinander hinsichtlich unterschiedlicher Parameter direkt untersucht werden (Arfors et al., 1975; Intaglietta & Tompkins, 1972).

Grundsätzlich stehen bei der Intravitalmikroskopie entweder die Trans- oder die Epiillumination zur Verfügung. Die Transillumination bietet zwar meist Bilder in höherer Auflösung und erlaubt die Beurteilung der Mikrozirkulation durch die gesamte Dicke der Muskelschicht, ist aber zur Mikroskopie des Myokards im hier verwendeten Transplantationsmodell aufgrund der Dicke des Herzmuskels nicht möglich. So erlaubt die epiillumineszenz Intravitalmikroskopie nur die Beurteilung der oberflächlichen Mikrozirkulation bei einer Eindringtiefe von ca. 200 – 500 μm . Allerdings kann es gerade hier verschiedene Störvariablen geben, welche die Aussagekraft der untersuchten oberflächlichen Areale einschränken können. Die Herzoberfläche und damit das zu untersuchende Areal ist während des Versuchs schädlichen Einwirkungen von außen ausgesetzt. Durch die mechanische Manipulation während der Operation und die Gefahr des Austrocknens der Herzoberfläche könnte die Beurteilbarkeit eingeschränkt werden (Germain et al., 2005). Um einer Schädigung vorzubeugen, erfolgt die Operation schonend mit mikrochirurgischen Instrumenten unter einem Operationsmikroskop. Außerdem wird das Herz während der Operationsschritte mit Hilfe von kalter physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten und zur Konservierung in kalte HTK-Lösung gelegt. Um eine relativ plane Oberfläche zur Mikroskopie am schlagenden Herzen zu schaffen und gleichzeitig das Herz zu schützen, wurde das zu untersuchende Myokardareal mit einem Deckglas bedeckt. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung auf das Herz aufgebracht, auf welchem dann das Deckglas durch Adhäsionskräfte zum Liegen kam und von einem Mikromanipulator stabilisiert wurde. Die dünne Schicht aus dann warmer Kochsalzlösung sorgte zum einen dafür, dass die Herzoberfläche u.a. vor Austrocknung geschützt wurde und zum anderen diente sie als Puffer zwischen Deckglas und Myokard. Diese Pufferwirkung ist wichtig, da durch das Gewicht des Deckglases und den Druck durch das Immersionsobjektiv die Mikrozirkulation in der zu mikroskopierenden Schicht beeinträchtigt werden könnte. Dieser Einfluss auf die Mikrozirkulation ist aber vernachlässigbar gering, sollte aber dennoch bei der Analyse der Messwerte zumindest bedacht werden.

Ein weiterer Punkt, der bei der Analyse berücksichtigt werden muss, ist, dass dreidimensionale Strukturen mikroskopiert werden, die Analyse allerdings nur an zweidimensionalen Bildern erfolgt. Durch das Verstellen der Fokusebene bei der Mikroskopie ist es meist aber trotzdem möglich sich einen Überblick über den gesamten Gefäßdurchmesser zu verschaffen. So sind subepikardiale Gefäße von bis zu einer Dicke von ca. 50 μm problemlos mikroskopierbar.

Zur Kontrastverstärkung und um die korpuskulären bzw. plasmatischen Blutbestandteile sichtbar zu machen wurde der Ratte vor der Intravitalmikroskopie ein Gemisch aus Natrium-Fluoreszin und 6G-

Rhodamin injiziert. Hierdurch konnte durch die Verwendung verschiedener Filter die Differenzierung dieser Strukturen vorgenommen werden. Ein Nachteil bei der Verwendung dieser Farbstoffe ist der mögliche Einfluss dieser auf die Mikrozirkulation sowie auf die Zell-Zell-Interaktion durch die durch Licht induzierte Phototoxizität (Lichtman & Conchello, 2005; Saetzler et al., 1997; Sorg et al., 2006). Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten wurden die Belichtungszeiten während der Mikroskopie so kurz wie möglich gehalten und die Lichtquelle zwischen den Untersuchungszeitpunkten ausgeschaltet.

4.1.4 Versuchsprotokoll

Die der hyperakuten und akut humoralen Abstoßungsreaktion zugrundeliegenden Mechanismen waren schon häufig Gegenstand bei der Erforschung der xenogenen Transplantatabstoßung. Meist wurden jedoch nur Rückschlüsse aufgrund von Antikörpertitern oder histopathologischer Merkmale getroffen (Steinbrüchel et al., 1992). Auch die Mikrozirkulation wurde bereits untersucht, allerdings nur an anderen Organen, nicht am Herzen. Am häufigsten wurde in diesem Zusammenhang die Mikrozirkulation xenogen transplanterter Lebern mittels Intravitalmikroskopie betrachtet (Seehofer et al., 1997; Linke et al., 1998). Das besondere Interesse galt allerdings der Mikrozirkulation des Herzens und dem, was wirklich während der Abstoßungsreaktion in den myokardialen Gefäßen geschieht, da dies der primäre Ort zu sein scheint, von dem die Transplantatabstoßung des Herzens ihren Ausgang nimmt (Platt et al., 1998).

Vorausgesetzt wird die Hypothese, dass bei der hyperakuten und der akut humoralen Abstoßungsreaktion binnen Minuten bis Stunden das Immunsystem aktiviert wird und es zu einer Endothelzellaktivierung kommt. Diese begünstigt durch proinflammatorische und prokoagulatorische Faktoren die Leukozyten- und Thrombozyteninteraktion, wodurch die Transplantatabstoßung eingeleitet wird (Platt, 2001). Hieraus folgend versuchten wir diese Zell-Zell-Interaktion in den subepikardialen Gefäßen erstmals mittels Intravitalmikroskopie sichtbar zu machen und zu analysieren. Hierzu mikroskopierten wir die subepikardialen Gefäße 30 bzw. 90 Minuten nach Reperfusion des Spenderorgans und verglichen diese beiden Zeitpunkte hinsichtlich Blutfluss, vaskulärer Leakage und Zell-Zell-Interaktion miteinander. Die Mikroskopiezeitpunkte wurden so gewählt, da die hyperakute und die akut humorale Abstoßungsreaktion zu diesen Zeitpunkten bereits in vollem Gange sein dürften. Gleichzeitig dürfte die akut zelluläre Abstoßung, aufgrund der längeren Latenz von Tagen bis Wochen, aber noch nicht eingesetzt haben (Platt, 2001). Außerdem sind durch die kürzere Versuchsdauer eventuell störende Effekte durch die Anästhesie und die Fluoreszenzfarbstoffe geringer, ebenso wie die Belastung für die Tiere.

Zusätzlich zur Gruppe der Tiere, bei denen ohne vorherige Sensibilisierung die Intravitalmikroskopie durchgeführt wurde (Gruppe 1), berücksichtigt das Protokoll außerdem eine Gruppe mit zuvor sensibilisierten Ratten (Gruppe 2) und eine Gruppe mit chronischem Verlauf (Gruppe 3), d.h. bis das Herz von der nicht-sensibilisierten Ratte komplett abgestoßen wurde. Bei den zuvor sensibilisierten Ratten wurde keine Intravitalmikroskopie durchgeführt, da die Herzen binnen weniger Sekunden abgestoßen wurden, und die Intravitalmikroskopie so aus zeitlichen Gründen nicht möglich war.

Bei allen Tieren wurden die Spenderherzen nach den Versuchen histologisch aufbereitet und anschließend die HE-gefärbten Histologieschnitte hinsichtlich des Ausmaßes der Abstoßungsreaktion analysiert. Mittels dieser Schnitte konnte die hyperakute Abstoßungsreaktion wie auch die akute Abstoßungsreaktion histologisch typisiert und zudem mit den Schnitten der Herzen nach Intravitalmikroskopie verglichen werden. Diese Analyse gestattet einen Anhaltspunkt wie weit die xenogene Abstoßungsreaktion nach 90-minütiger Intravitalmikroskopie vorangeschritten ist und welche Charakteristika diese aufweist. Die histologische Analyse erfolgte semiquantitativ anhand von Nekrosen, Hämorrhagien, Infiltrate mononukleärer Zellen und Gefäßverschlüssen in Anlehnung an den ISHLT-Score zur Graduierung der akuten Abstoßungsreaktion nach allogener Herztransplantation (Stewart et al., 2005).

Des Weiteren wurde bei den Tieren aller Versuchsgruppen nach den Versuchen eine Blutanalyse durchgeführt. Hier lag das besondere Augenmerk auf dem Gerinnungsstatus, Veränderungen des Blutbildes und einer serologischen Analyse der Myokardmarker und des Serum-Kaliums. Von besonderem Interesse beim Gerinnungsstatus war eine eventuelle Veränderung aufgrund der bereits beschriebenen Koagulopathie (Lin et al., 2009). Auch eventuelle Veränderungen des Blutbildes, wie z.B. ein Abfall der Thrombozyten, könnten Hinweise für eine Gerinnungsstörung liefern (Cowan et al., 2000). Eine Veränderung des Leukozytenwertes könnte Hinweise auf die Aktivierung des Immunsystems und die ablaufende Transplantatabstoßung geben. Die Myokardmarker Troponin I, Kreatinkinase und Myoglobin geben einen Anhalt über das Ausmaß der Myokardschädigung. Diese liefert einen Hinweis über den Herzmuskelschaden im Rahmen der Abstoßungsreaktion, kann aber auch durch das chirurgische Trauma und die Ischämie während der Transplantation beeinflusst werden (Adams et al., 1993). Dies ist insbesondere bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen. Das Serum-Kalium, welches eine wichtige Rolle bei der Erregung der Herzmuskelzellen spielt, liefert Hinweise über die Erregbarkeit des Myokards und kann gleichzeitig bei dessen Erhöhung auf eine Entzündungsreaktion der Herzmuskelzellen und auf eine Zelllyse hindeuten. Erhöhte Werte könnten aber auch durch die HTK-Lösung, welche zuvor zur Perfusion und Konservierung des Spenderherzens verwendet würde, verursacht werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Mikrozirkulation

Die Daten bezüglich der Mikrozirkulation in den rechtsventrikulären, subepikardialen, postkapillären Koronarvenolen zeigen eine signifikant erhöhte Blutflussgeschwindigkeit in diesen Gefäßen 90 Minuten nach Reperfusion im Vergleich zum Wert nach 30 Minuten. Auch der volumetrische Blutfluss nach 90 Minuten nimmt deutlich zu, mit einem p-Wert von 0,052 ist dieser Anstieg statistisch allerdings nicht mehr signifikant. Dieser Anstieg des Blutflusses ist am ehesten auf eine reaktive Hyperämie nach Reperfusion zurückzuführen, wie sie bereits mehrfach beschrieben wurde (Contaldo et al., 2007; Schramm et al., 2007) und nicht auf einen reinen Effekt der xenogenen Abstoßungsreaktion.

Bei der Leakage als Parameter für die endotheliale Dysfunktion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten 30 und 90 Minuten nach Reperfusion. Dies ist allerdings dem Umstand geschuldet, dass bereits bei der Messung des 30-Minutenwerts die Leakage für Natrium-Fluoreszin so hoch war, dass sich mehr Farbstoff außerhalb als innerhalb der Gefäße befand. Diese hohe Leakage bereits nach 30 Minuten spricht für eine starke endotheliale Dysfunktion bereits kurz nach Reperfusion. Eine erhöhte vaskuläre Permeabilität wurde bereits als Folge der postischämischen mikrovaskulären Dysfunktion beschrieben, allerdings war die hier gemessene Leakage bei weitem nicht so ausgeprägt wie in den hier vorliegenden Versuchen (Schramm et al., 2010). So betrug die mikrovaskuläre Permeabilität in unseren Versuchen 30 Minuten nach Reperfusion $127,8 \pm 3,3$ % und 90 Minuten nach Reperfusion $131,6 \pm 4,2$ %, bei einer durchschnittlichen kalten Ischämiezeit von < 30 Minuten. Sie war damit über 60 % höher als die von Schramm et al. (Schramm et al., 2007) gemessene Leakage für FITC-Dextran nach Herz-Allotransplantation zwischen Mäusen und vergleichbarer Ischämiezeit. Dies spricht für einen starken Einfluss der xenogenen Abstoßungsreaktion, beispielsweise durch die Komplementaktivierung und die Zerstörung der endothelialen Barriere, auf die mikrovaskuläre Permeabilität. Zu beachten ist allerdings, dass hier aufgrund einer möglichen anaphylaktoiden Reaktion der Ratten gegenüber Dextran kein FITC-Dextran, sondern Natrium-Fluoreszin verwendet wurde (Carnuccio et al., 1989). Im Gegensatz zu dem Molekulargewicht von FITC-Dextran mit 70.000 Dalton, beträgt das Molekulargewicht von Natrium-Fluoreszin nur 276,27 Dalton. Somit kann ein direkter Vergleich nur eingeschränkt getroffen werden.

Hinsichtlich der Zell-Endothel-Interaktion, als weiterer Parameter für die Endothelaktivierung und die ablaufende Abstoßungsreaktion, wurde einerseits ein Anstieg der adhärenenten und rollenden Leukozyten um 32 % bzw. 52,3 % und andererseits ein Abfall der adhärenenten und rollenden Thrombozyten um 16,8 % bzw. 62,5 % zwischen 30 und 90 Minuten nach Reperfusion beobachtet.

Diese Werte waren statistisch allerdings nicht signifikant. Dennoch liefern sie einen Anhalt über die mikrovaskulären Mechanismen der Abstoßungsreaktion. Der Anstieg der Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel ist ein Indiz für die Aktivierung des Immunsystems. Der Abfall der Thrombozyten andererseits könnte durch deren Verbrauch im Rahmen der Hyperkoagulabilität verursacht werden, wie sie bei der hyperakuten und akuten xenogenen Abstoßungsreaktion beschrieben wird (Lin et al., 2009). Im Blutbild der Gruppe der intravital mikroskopierten Ratten konnte diesbezüglich allerdings kein Zusammenhang gefunden werden. Dies könnte aber auch auf ein Problem bei der Blutentnahme, wie z.B. eine zeitversetzte Blutentnahme oder die Verdünnung durch die Farbstoffe beeinflusst sein. Außerdem ist zu diskutieren, ob durch eine dritte Messung, beispielsweise 240 Minuten nach Reperfusion, dieser Trend bestätigt werden könnte und ob die Ergebnisse dann statistisch signifikant wären, aufgrund der stärkeren Ausprägung der akut humoralen Abstoßungsreaktion zu einem späteren Zeitpunkt.

Die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten und der rollenden Thrombozyten 30 und 90 Minuten nach Reperfusion unterschied sich nicht signifikant voneinander. Sowohl bei den Leukozyten als auch bei den Thrombozyten nahm die Geschwindigkeit der rollenden Zellen gering zu, allerdings auch nicht signifikant. Diese geringe Zunahme der Geschwindigkeit könnte auf die allgemein erhöhte Blutflussgeschwindigkeit 90 Minuten nach Reperfusion zurückzuführen sein.

4.2.2 Klinische Chemie

Die Serumwerte der Versuchstiere waren vor allem bezüglich der Myokardmarker, also Kreatinkinase, Troponin I und Myoglobin auffällig. Da das Myoglobin und die Kreatinkinase eher unspezifische Marker für den Untergang von Muskelzellen sind (Adams et al., 1993) und deshalb sowohl durch das operative Trauma bei der Transplantation, als auch durch die Muskelverletzung bei der Blutentnahme bei den Kontrolltieren, da hierzu die Vena jugularis freipräpariert wurde, verfälscht werden könnten, ist deren sinnvolle Interpretation in Bezug auf die Abstoßungsreaktion nur fraglich möglich. So ist die starke Erhöhung der Kreatinkinase in den Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe vermutlich auf das größere operative Trauma zusammen mit dem Untergang von Herzmuskelzellen im Zuge der Abstoßungsreaktion zurückzuführen. Auch die Heterogenität der Myoglobinwerte ist vermutlich durch die Schädigung von Muskelzellen im Rahmen des operativen Traumas sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe, gemeinsam mit der sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von Myoglobin (de Winter et al., 1995), verursacht. Ein spezifischer Parameter für die Myokardschädigung ist jedoch ein Anstieg von Troponin I (Adams et al., 1993). Das Troponin I war in der Kontrollgruppe nicht erhöht nachweisbar und zugleich in den drei Versuchsgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Troponin I-

Anstieg. Da das Troponin I relativ rasch nach einer Myokardschädigung ansteigt und außerdem über Tage erhöht nachweisbar ist, ist auch hier, zumindest bei den Tieren der Gruppe 1 ein Einfluss durch die Ischämie und Manipulation während der Operation zu berücksichtigen. Die Versuchstiere der Gruppe 1 zeigten allerdings, wenn auch statistisch nicht signifikant gegenüber den anderen Versuchsgruppen, die niedrigsten Troponin I-Level, so dass bei den Tieren der Gruppe 2 und Gruppe 3 die hohen Level größtenteils durch den Myokarduntergang im Rahmen der Abstoßung verursacht werden. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen der Analyse der Histologieschnitte, in denen flächige Nekrosen in diesen Gruppen zu erkennen sind (vgl. 3.3).

Die Blutgerinnung des intrinsischen Gerinnungssystems war in allen Versuchsgruppen statistisch nicht von der Kontrollgruppe abweichend. Die extrinsische Blutgerinnung war bei den Versuchstieren der Gruppe 3 mit einem Quick-Wert von $151,0 \pm 2,45$ % erhöht. Da keine Substanzen verwendet wurden die die extrinsische Blutgerinnung beeinflussen, müsste diese Verlängerung durch eine Aktivierung der Gerinnung im Rahmen der akuten Abstoßungsreaktion verursacht werden (Ierino et al., 1998; Robson et al., 2000). Gleichzeitig war bei der Versuchsgruppe 3 sowohl das Fibrinogen, als auch der Antithrombinwert gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Der starke Anstieg des Fibrinogens als Akute-Phase-Protein auf $509,0 \pm 37,1$ mg/dl, ist durch die Inflammation im Zuge der akuten Abstoßungsreaktion zu erklären (Robson et al., 1999). Bei den Tieren der Gruppe 1 und Gruppe 2 war jeweils das Antithrombin gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt. Diese Verringerung der Antithrombinkonzentration ist durch die Aktivierung der Blutgerinnung sowohl bei der hyperakuten, als auch bei der akut humoralen Abstoßungsreaktion zu erklären, bei der das Antithrombin zunächst im Rahmen der Gegenregulation verbraucht wird (Dickneite, 1998; Robson et al., 2000).

Im Blutbild der Versuchsgruppe 3 fiel eine signifikante Erhöhung der Leukozyten und in der Versuchsgruppe 2 eine signifikante Erniedrigung der Leukozyten gegenüber der Kontrollgruppe auf. Im Verlauf der xenogenen Abstoßungsreaktion kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems mit einer Migration von Leukozyten (Linke et al., 1998). Dies erklärt bei der akut vaskulären (humoralen) Abstoßung zu Beginn den Abfall der Leukozyten im peripheren Blut und deckt sich mit unseren Daten der IVM. Durch die Aktivierung des Immunsystems kommt es aber gleichzeitig zu einer vermehrten Bildung von Leukozyten, was den erhöhten Leukozytenwert in Gruppe 3 nach $3,2 \pm 0,2$ Tagen erklärt. Eine signifikante Änderung der Leukozytenzahl der Tiere in Gruppe 1 war aufgrund der höheren zeitlichen Latenz der akut humoralen Abstoßungsreaktion im Vergleich zur hyperakuten Abstoßungsreaktion nicht zu sehen (Robson et al., 1999).

Im roten Blutbild der Versuchsgruppe 3 war sowohl ein statistisch signifikanter Abfall der Erythrozyten wie auch des Hämoglobins zu erkennen. Auch dies könnte durch die Inflammation, Hämolyse und den Eisenmangel bei der akut xenogenen Abstoßungsreaktion zu erklären sein, sowie durch die Ausbildung von Thromben und Hämorrhagien im Graft (vgl. 3.3) verstärkt werden (Blosser & Bloom,

2010; Platt et al., 1998). In der Versuchsgruppe 1 war dagegen ein Anstieg sowohl der Erythrozyten, als auch des Hämoglobinwerts zu sehen. Dieser Anstieg erklärt sich durch die erhöhte vaskuläre Leakage und den damit verbundenen Plasmaverlust nach extravasal, wodurch es zu einer intravasalen Konzentration der roten Blutzellen kommt (vgl. 3.1.3). Aufgrund des raschen Einsetzens der hyperakuten Abstoßungsreaktion war diese Veränderung in Versuchsgruppe 2 noch nicht im Blutbild zu erkennen.

Die Thrombozytenzahl unterschied sich in keiner der Versuchsgruppen signifikant von der Kontrollgruppe. Die von anderen Versuchsgruppen (Platt et al., 1998) beschriebene Thrombozytopenie bei der akuten vaskulären Abstoßungsreaktion konnte von uns also nicht beobachtet werden.

Zu bedenken bei der Interpretation der Ergebnisse der klinischen Chemie, zumindest der Ergebnisse der Versuchsgruppe 1, ist ein möglicher Verdünnungseffekt durch die intravasal injizierten Fluoreszenzfarbstoffe zur Intravitalmikroskopie. In Zusammenschau der Ergebnisse, insbesondere in Hinblick auf das Blutbild, ist dieser Effekt aber eher als gering zu betrachten bzw. zu vernachlässigen.

4.2.3 Histologie

Die Ergebnisse der histologischen Analysen decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Pino-Chavez, 2001; Platt et al., 1991; Steinbrüchel et al., 1992; Nielsen et al., 1992) bezüglich der histopathologischen Merkmale der xenogenen Abstoßungsreaktion.

Die Grafts der Tiere der Gruppe 1 und Gruppe 3, welche die akut vaskuläre (humorale) Abstoßungsreaktion unterliefen, zeigten flächige Nekrosen, Hämorrhagien, mononukleäre Infiltrate sowie eine Verbreiterung der interstitiellen Räume. Im Vergleich zu den Grafts der Gruppe 1, welche nur ca. 90 Minuten mit Rattenblut perfundiert und noch nicht vollständig abgestoßen wurden, waren diese Veränderungen bei den Grafts der Gruppe 3, welche $3,2 \pm 0,2$ Tagen mit Rattenblut perfundiert und vollständig akut abgestoßen wurden, stärker ausgeprägt. So waren die Ergebnisse des Histologie-Scores hinsichtlich Nekrosen, mononukleären Infiltraten und Hämorrhagien statistisch signifikant unterschiedlich zwischen diesen Versuchsgruppen. Dies ist durch die zunächst noch niedrigen Titer an xenoreaktiven Antikörpern im konkordanten Versuchsmodell zu erklären (Lin et al., 1998; Steinbrüchel et al., 1992). Steinbrüchel et al. (Steinbrüchel et al., 1992) führten bereits eine histomorphologische und Antikörper-Analyse bei konkordant xenogen transplantierten Hamsterherzen an Lewis-Ratten durch. Hierzu wurden Histologieschnitte und Antikörperanalysen 4-6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Transplantation durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen ähnlich wie die hier vorliegenden Ergebnisse in Versuchsgruppe 1 nur diskrete histomorphologische Veränderungen nach 4-6 bzw. 24 Stunden mit leichtem interstitiellem Ödem und Verlust der myokardialen

Mikroarchitektur bei anfangs noch niedrigen Titern an Xeno-Antikörpern. Jedoch beschreiben Steinbrüchel et al. trotz des längeren Zeitraums nach Transplantation bis zur Untersuchung im Gegensatz zu unseren Ergebnissen keine Nekrosen oder Hämorrhagien. Erst nach 48 Stunden werden bei Steinbrüchel et al. eine Vaskulitis mit fokalen Nekrosen, Leukozyteninfiltration und Thrombosen beschrieben.

Die Histomorphologie der hyperakuten Abstoßung ist der Histomorphologie der akut humoralen Abstoßungsreaktion sehr ähnlich, da es bei beiden u.a. über xenoreaktive Antikörper - bei der HAR sind dies hauptsächlich präformierte natürliche Antikörper, wohingegen bei der AVR eher induzierte xenoreaktive Antikörper eine Rolle spielen - zu einem Verlust der zellulären Integrität bzw. Zellyse und letztlich zur Transplantatabstoßung kommt (Pino-Chavez, 2001; Platt et al., 1998). Die hyperakut abgestoßenen Grafts (Gruppe 2) zeigten histologisch deutliche Nekrosen, mononukleare Infiltrate und Hämorrhagien. Diese Veränderungen waren im Vergleich zu den Histologien der Grafts aus der Gruppe 3 zwar statistisch signifikant weniger stark ausgeprägt, allerdings im Vergleich zu den Kontrollherzen signifikant erhöht.

Die häufig beschriebenen thrombotischen Gefäßverschlüsse als histologisches Charakteristikum der xenogenen Transplantatabstoßung (Pino-Chavez, 2001; Steinbrüchel et al., 1992) konnten wir in unseren histologischen Schnitten zwar finden, jedoch waren diese in allen Versuchsgruppen statistisch nicht signifikant häufiger vorhanden als in den Kontrollschnitten.

4.2.4 Überlebenszeit der Grafts

Die Überlebenszeit der Grafts, definiert durch eine sichtbare bzw. palpable Herzaktion, betrug in Versuchsgruppe 3 $3,2 \pm 0,2$ Tage. Diese Zeit bis zur vollständigen Transplantatabstoßung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien in diesem Modell zur akut humoralen Abstoßungsreaktion. Im Vergleich zur allogenen Herztransplantation zwischen Mäusen, wo die Zeit bis zur vollständigen Transplantatabstoßung mit 7 – 10 Tagen angegeben wird (Schramm et al., 2010), ist der von uns gemessene Zeitraum bis zur vollständigen Transplantatabstoßung im konkordanten xenogenen Modell deutlich verkürzt.

Die Graft-Überlebenszeit bei den Ratten, die zuvor mit Hamsterblut sensibilisiert wurden und die Herzen somit hyperakut abgestoßen haben, betrug im Mittel $14,8 \pm 2,8$ Sekunden. Auch hier gab es keine starken Abweichungen zu Ergebnissen anderer Studien in diesem Modell (Zhang et al., 2000).

Die zeitlich unterschiedliche Graft-Überlebenszeit im xenogenen Modell lässt sich dadurch erklären, dass bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion die xenoreaktiven Antikörper schon präformiert sind und somit die Komplementaktivierung und die hyperakute Abstoßung direkt mit der Reperfusion massiv beginnen. Bei der akut humoralen Abstoßung müssen die xenoreaktiven Antikörper jedoch

zuerst noch gebildet werden, was unter anderem die längere Latenzzeit bis zur Transplantatabstoßung erklärt (Lin et al., 1998).

5. Zusammenfassung

Die Herztransplantation stellt, trotz der großen Fortschritte in der Therapie terminaler Herzerkrankungen, häufig noch immer die letzte Therapieoption dieser Erkrankungen dar. Aufgrund des enormen Spendermangels sind geeignete Organe allerdings sehr knapp. Die xenogene Herztransplantation, im Speziellen die Transplantation von Schweineherzen an den Menschen, könnte dieses Problem lösen. Allerdings ist die Xenotransplantation noch weit von der klinischen Implementierung entfernt. Das Hauptproblem dabei stellt die Beherrschung der xenogenen Abstoßungsreaktion dar. Zwar kann die hyperakute Abstoßungsreaktion durch gentechnisch veränderte Spenderschweine inzwischen relativ gut beherrscht werden, bei der akut vaskulären (humoralen) Abstoßung hingegen ist dies noch nicht der Fall.

Die pathophysiologischen Vorgänge während der xenogenen Abstoßungsreaktion sind noch nicht vollständig verstanden. Vorliegende Daten deuten aber auf eine ausgeprägte Koagulopathie mit einer Störung der Mikrozirkulation und Thrombosen im Rahmen der hyperakuten und akut humoralen Abstoßungsreaktion hin. Es ist unabdingbar notwendig die Mechanismen der xenogenen Abstoßungsreaktion genau zu kennen, damit man gezielt eingreifen kann. Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Abstoßungsreaktion besser zu verstehen, war das Ziel dieser Arbeit ein neues Kleintiermodell zu etablieren, anhand dessen die Mikrozirkulation in vivo mittels Intravitalmikroskopie direkt am schlagenden Herzen sowohl quantitativ als auch qualitativ untersucht werden kann.

Um dies zu erreichen wurden Herzen von Syrischen Goldhamstern heterotop an die Halsgefäße von Lewis-Ratten transplantiert. In drei Versuchsgruppen wurde nun die xenogene Abstoßungsreaktion untersucht. In Gruppe 1 wurde mittels Intravitalmikroskopie die subepikardiale Mikrozirkulation nach Reperfusion über dem rechten Ventrikel des Hamsterherzens untersucht. Die Ratten in Versuchsgruppe 2 wurden sieben Tage vor der xenogenen Herztransplantation mit Hamsterblut sensibilisiert, um die Bildung von xenoreaktiven Antikörpern zu induzieren und so eine hyperakute Abstoßung zu provozieren. Bei den Tieren aus Versuchsgruppe 3 wurde ohne vorherige Sensibilisierung nach der Transplantation das Operationsgebiet wieder verschlossen, um die Dynamik und Kinetik bis zur vollständigen Transplantatabstoßung zu untersuchen. In allen Versuchsgruppen wurden außerdem histologischen Analysen sowie Analysen des Blutbildes, Gerinnungsstatus und der Myokardmarker durchgeführt.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten zeigen, dass die Herzen der ersten und dritten Versuchsgruppe akut vaskulär (humoral) abgestoßen werden, bei einer durchschnittlichen Zeit bis zur vollständigen Abstoßung von $3,2 \pm 0,2$ Tagen. Die Hamsterherzen aus der zweiten Versuchsgruppe wurden hingegen nach vorheriger Sensibilisierung hyperakut in $14,8 \pm 2,8$ Sekunden vollständig abgestoßen.

Die Analyse der Mikrozirkulation mittels Intraviralmikroskopie zeigte einen Anstieg des Blutflusses in den Spenderherzen, welcher als reaktive Hyperämie nach Reperfusion zu deuten ist. Des Weiteren ist eine sehr hohe endotheliale Leakage auffällig, die für eine bereits sehr frühe Endothelaktivierung im Rahmen der akut humoralen Abstoßung spricht. Bezüglich der Zell-Endothel-Interaktion könnte weder bei den Leukozyten noch bei den Thrombozyten eine signifikante Veränderung zwischen 30 und 90 Minuten nach Reperfusion gefunden werden. Gleichwohl wurden aber ein Anstieg der Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel sowie einen Abfall der Thrombozyten-Endothel-Interaktion gefunden, welche ebenfalls für eine Endothelzellaktivierung im Rahmen der ablaufenden akuten Abstoßungsreaktion sprechen.

Auch die Blutwerte bestätigten die Annahmen über die ablaufende Abstoßungsreaktion. So waren in allen Gruppen die sog. Myokardmarker deutlich erhöht, was für einen myokardialen Schaden sowohl durch das operative Trauma, als auch durch die Abstoßungsreaktion spricht. Des Weiteren wurde in Versuchsgruppe 2, also der Gruppe die das Hamsterherz nach ca. 3 Tagen akut vaskulär (humoral) abgestoßen hat, ein deutlicher Anstieg des Leukozytenwertes sowie eine Verlängerung des Quick-Wertes gefunden, was unter anderem für eine starke Stimulation des Immunsystems und eine Koagulopathie im Rahmen der akut xenogenen Transplantatabstoßung spricht.

Ebenso deckten sich die Histologien der drei Versuchsgruppen mit diesen Annahmen und den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen zu diesem Thema. Die Herzen, die die akut vaskuläre (humorale) Abstoßungsreaktion unterliefen, zeigten bereits 90 Minuten nach Reperfusion (Versuchsgruppe 1) erste Anzeichen der Transplantatabstoßung, wie beginnende Nekrosen und Einblutungen. Nach vollständiger Transplantatabstoßung (Versuchsgruppe 3) waren hingegen flächenhafte Nekrosen sowie Hämorrhagien und perivaskulär Infiltrate mononuklearer Zellen vorhanden. Die hyperakut abgestoßenen Hamsterherzen (Versuchsgruppe 2) zeigten im Vergleich zu den akut abgestoßenen Herzen ein ähnliches, wenn auch weniger ausgeprägtes Bild der Transplantatzerstörung mit Nekrosen, Hämorrhagien und Infiltraten mononuklearer Zellen. Thrombotische Gefäßverschlüsse konnten sowohl bei den hyperakut als auch bei den akut vaskulär (humoral) abgestoßenen Herzen vereinzelt gefunden werden.

Zusammenfassend konnte erstmals die mikrovaskulären Mechanismen und die Koagulopathie während der akut vaskulären (humoralen) Abstoßungsreaktion sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden. Hierbei deckten sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Daten anderer Forschungsgruppen weitestgehend. Somit wurde dieses Kleintiermodell erfolgreich etabliert. Insbesondere eignet sich dieses Modell zur Erforschung verschiedenster Strategien zur Verhinderung der xenogenen Abstoßungsreaktion und deren mikrovaskulären Einflüsse.

6. Abkürzungsverzeichnis

>	größer
<	kleiner
α 1,3GT	α (1,3)Galaktosyltransferasen
A.	Arterie
ACR	Akute zelluläre Abstoßungsreaktion
AK	Antikörper
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aPTT-R	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit – Ratio
AT	Antithrombin
AVR	Akut vaskuläre (humorale) Abstoßungsreaktion
CAR	Chronische Abstoßungsreaktion
CK	Keratinkinase
CMV	Cytomegalie-Virus
CVF	Cobra-Venom-Faktor
DAF	decay accelerating factor
D-Dim	D-Dimer
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
Ery	Erythrozyten
Fibr	Fibrinogen
FITC-Dextran	Fluorescein isothiocyanate-Dextran
G	Gauge
GAL	Galaktose- α (1,3)Galaktose
Gefäßverschl.	Gefäßverschlüsse
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion
Hämorrh.	Hämorrhagien
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
IL1 α	Interleukin-1 α
IL8	Interleukin 8
INR	International Normalized Ratio
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation

IVM	Intravitalmikroskopie
K	Kalium
Leu	Leukozyten
M.	Musculus
MAC	Membrane-Attack-Complex
MCP	membrane cofactor protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mononukl. Z.	Mononukleäre Zellen
Myo	Myoglobin
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PNAK	Präformierte natürliche Antikörper
Q	Quick
sCR1	Komplement-Rezeptor Typ I
TF	Tissue Factor
TXA2	Thromboxan A2
Throm	Thrombozyten
Trop I	Troponin I
V.	Vene
VCI	Vena cava inferior

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1.1	Herz-Warteliste und Transplantationen	2
Abb. 1.2	Wartezeit auf der Herztransplantationswarteliste	3
Abb. 1.3	Immunantwort nach Xenotransplantation	7
Abb. 1.4	Komplementaktivierung	8
Abb. 1.5	Pathogenese der AVR	9
Abb. 1.6	Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes auf Atomebene	14
Abb. 1.7	Strahlengang im Epifluoreszenzmikroskop	15
Abb. 2.1	Perfusion des Hamsterherzens	18
Abb. 2.2	Explantiertes Hamsterherz	19
Abb. 2.3	Anbringung des Cuffs	19
Abb. 2.4	Gefäße mit angebrachten Cuffs	20
Abb. 2.5	Reperfusion des Spenderherzens	20
Abb. 2.6	Versuchsaufbau	22
Abb. 3.1	IVM-Bilder nach 30 Minuten	27
Abb. 3.2	IVM- Bilder nach 90 Minuten	28
Abb. 3.3	Blutflussgeschwindigkeit	29
Abb. 3.4	Volumetrischer Blutfluss	30
Abb. 3.5	Leakage	31
Abb. 3.6	Adhärente Leukozyten	32
Abb. 3.7	Rollende Leukozyten	33
Abb. 3.8	Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten	34
Abb. 3.9	Adhärente Thrombozyten	35
Abb. 3.10	Rollende Thrombozyten	36
Abb. 3.11	Geschwindigkeit der rollenden Thrombozyten	37
Abb. 3.12	Histologieschnitte der naiven Rattenherzen	43
Abb. 3.13	Histologieschnitte der Hamsterherzen nach IVM	44
Abb. 3.14	Histologieschnitte der hyperakut abgestoßenen Hamsterherzen	45
Abb. 3.15	Histologieschnitte der akut abgestoßenen Hamsterherzen	46

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Beschreibung	Seite
Tab. 1.1	Geschichte der Herz-Xenotransplantation	4
Tab. 2.1	Parameter der klinischen Chemie	24
Tab. 2.2	Histologie-Score	25
Tab. 3.1	Ergebnisse Intravitalmikroskopie	38
Tab. 3.2	Ergebnisse der klinischen Chemie	39
Tab. 3.3	Ergebnisse histologische Analyse	42

9. Literaturverzeichnis

- Adams, J., Bodor, G., Davila-Roman, V., Delmez, J., Apple, F., Ladenson, J., & Jaffe, A. (1993). Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*, pp. 88: 101-106 .
- Arfors, K., Bergqvist, D., Intaglietta, M., & Westergren, B. (1975). Measurements of blood flow velocity in the microcirculation. *Ups J Med Sci*, p. 80:27.
- Arvidsson, D., Svensson, H., & Haglund, U. (1988). Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.*, pp. 254:471-476.
- Bach, F., Ferran, C., Hechenleitner, P., Mark, W. K., Miyatake, T., Winkler, H., . . . Hancock, W. (1997). Accommodation of vascularized xenografts: Expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature Medicine*, pp. 196-204.
- Bailey, L., Nehlsen-Cannarella, S., Concepcion, W., & al., e. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, p. 254: 3321.
- Blosser, C., & Bloom, R. (2010). Posttransplant anemia in solid organ recipients. *Transplant Rev*, pp. 24(2):89-98.
- Calne, R. (1970). Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc.*, pp. 2(4):550-6.
- Carnuccio, R., Di Rosa, M., Ialenti, A., Iuvone, T., & Sautebin, L. (1989). Selective inhibition by vasocortin of histamine release induced by dextran and concanavalin-A from rat peritoneal cells. *Br. J. Pharmacol*, pp. 98, (32-34).
- Carrel, A. (1902). La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.*, p. 98: 858.
- Chapman, L., Folks, T., Salomon, D., Patterson, A., Eggerman, T., & Noguchi, P. (1995). Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med.*, pp. 333(22):1498-501.
- Contaldo, C., Meier, C., Elsherbiny, A., Harder, Y., Trentz, O., Menger, M., & Wanner, G. (2007). Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *AJP-Heart*, pp. (293)1:274-283 .
- Cooper, D., Human, P., Lexer, G., Rose, A., Rees, J., Keraan, M., & Du Toit, E. (1988). Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplantation*, pp. 7(3):238-46.
- Cowan, P., Aminian, A., Barlow, H., Brown, A., Chen, C., Fiscaro, N., . . . d'Apice, A. (2000). Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation*, pp. 69(12):2504-15.
- Cozzi, E., & Ancona, E. (2003). Xenotransplantation, where do we stand? *J.Nephrol.*, pp. 16 Suppl 7:S16-21.

- Cramer, D. (2000). Natural antibodies and the host immune responses to xenografts. *Xenotransplantation*, pp. 7: 83-92.
- Daar, A. (1997). Ethics of Xenotransplantation: Animal Issues, Consent, and Likely Transformation of Transplant Ethics. *World J.Surg.*, pp. 21 975-982.
- de Winter, R., Koster, R., Sturk, A., & Sanders, G. (1995). Value of Myoglobin, Troponin T, and CK-MBmass in Ruling Out an Acute Myocardial Infarction in the Emergency Room . *Circulation*, pp. 92: 3401-3407 .
- Deschamps, J.-Y., Roux, F., Sai, P., & Gouin, E. (2005). History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 12: 91-109.
- Dickneite, G. (1998). Antithrombin III in Animal Models of Sepsis and Organ Failure. *Semin Thromb Hemost*, pp. 24(1): 61-69.
- DSO, D. S. (2011). *Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland*.
- Ekser, B., & Cooper, D. (2010, March). Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol.*, pp. 6(2): 219-230.
- Eurotransplant International Foundation. (2011). *Annual Report 2010*. Retrieved Juli 26, 2011, from http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2010.pdf
- Farr, A. (1980). The first human blood transfusion. *Med Hist*, p. 24: 143.
- Fryer, J., Leventhal, J., & Matas, A. (1995). The emergence of xenotransplantation. *Transpl.Immunol.*, pp. (3) 21-31.
- Galili, U., Clark, M., Shohet, S., Buehle, J., & Macher, B. (1987). Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1-3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 84:1369-1373.
- Germain, R., Miller, M., Dustin, M., & Nussenzweig, M. (2005). Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nature Reviews Immunology*, pp. 6:497-507.
- Good, A., Cooper, D., Malcolm, A., Ippolito, R., Koren, E., Neethling, F., . . . Lamontagne, L. (1992). Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc.*, pp. 24(2):559-62.
- Hammer, C., Linke, R., Wagner, F., & Diefenbeck, M. (1998). Organs from animals for man. *Int.Arch.Allergy Immunol.*, pp. (116) 5-21.
- Hardy, J., Chavez, C., Kurrus, F., & al., e. (1964). Heart transplantation in man: developmental studies and report of a case. *JAMA*, p. 188: 1132.
- Hardy, M., Oluwole, S., Fawwaz, R., Satake, K., Nowygrod, R., & Reemtsma, K. (1982). Selective lymphoid irradiation. Prolongation of cardiac xenografts and allografts in presensitized rats. *Transplantation*, pp. 33:237-242.

- Hasan, R., van den Bogaerde, J., Wallwork, J., & White, D. (1992). Evidence that long-term survival of concordant xenografts is achieved by inhibition of antispecies antibody production. *Transplantation*, pp. 54 (3):408-413.
- Hendel, P., Lilien, D., & Buncke, H. (1983). A study of pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part I. *Plast Reconstr Surg*, p. 71:387.
- Heron, I. (1971). A technique of accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Pathol Microbiol Scand*, pp. 79:366-372.
- Hoopes, C., & Platt, J. (1996). Molecular strategies for clinical xenotransplantation in cardiothoracic surgery. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, pp. 8(2):156-74.
- Ierino, F., Kozlowski, T., Siegel, J., Shimizu, A., Colvin, R., Banerjee, P., . . . Robson, S. (1998). Disseminated intravascular coagulation in association with the delayed rejection of pig-to-baboon renal xenografts. *Transplantation*, pp. 66(11):1439-1450.
- Intaglietta, M., & Tompkins, W. (1972). On-line measurements of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol*, p. 32:546.
- Kissmeyer-Nielsen, F., Olsen, S., Peterson, V., & Fjeldborg, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral. *Lancet* 2, pp. 662-665.
- Knechtle, S., Halperin, E., Tahani Saad, B., & Bollinger, R. (1986). Prolonged heart xenograft survival using combined total lymphoid irradiation and cyclosporine. *J Heart Transplant*, pp. 5:254-261.
- Kobayashi, T., Taniguchi, S., Neethling, F., Rose, A., Hancock, W., Ye, Y., . . . Cooper, D. (1997, November). Delayed Xenograft Rejection of Pig-to-Baboon Cardiac Transplants After Cobra Venom Factor Therapy. *Transplantation*, pp. 1255-1261.
- Kozlowski, T., Monroy, R., Xu, Y., Glaser, R., Awwad, M., Cooper, D., & Sachs, D. (1998, Juli). Anti-Gal[alpha]1-3Gal Antibody Response To Porcine Bone Marrow In Unmodified Baboons And Baboons Conditioned For Tolerance Induction. *Transplantation*, pp. 176-182.
- Kuwaki, K., Knosalla, C., Dor, F., Gollackner, B., Tseng, Y., Houser, S., . . . Cooper, D. (2004, März). Suppression of Natural and Elicited Antibodies in Pig-to-Baboon Heart Transplantation Using a Human Anti-Human CD154 mAb-Based Regimen. *American Journal of Transplantation*, pp. 363-372.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K., Cheong, H., Greenstein, J., Im, G., . . . Prather, R. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, pp. 295: 1089-1092.
- LaVecchio, J., Dunne, A., & Edge, A. (1995). Enzymatic removal of alpha-galactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. *Transplantation*, pp. 60(8):841-7.
- Leventhal, J., John, R., Fryer, J., Witson, J., Derlich, J., Remiszewski, J., . . . Bolman, R. (1995). Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoabsorption. Results of in vitro and in vivo studies. *Transplantation*, pp. 59(2):294-300.

- Leventhal, J., Matas, A., Sun, L., Reif, S., III, B. R., Dalmaso, A., & Platt, J. (1993, July). The Immunopathology Of Cardiac Xenograft Rejection In The Guinea Pig-To-Rat Model. *Transplantation*.
- Lichtman, J., & Conchello, J. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, pp. 2:910-919.
- Lin, C., Cooper, D., & Dorling, A. (2009). Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl Immunol.*, pp. (2):75-80.
- Lin, S., Weidner, B., Byrne, G., Diamond, L., Lawson, J., Hoopes, C., . . . Platt, J. (1998, April). The Role of Antibodies in Acute Vascular Rejection of Pig-to-Baboon Cardiac Transplants. *J. Clin. Invest.*, pp. Volume 101, Nr. 8, 1745-1756.
- Lindbom, L., Tuma, R., & Arfors, K. (1982). Blood flow of the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observations. *Acta Physiol Scand*, p. 114:121.
- Linke, R., Wagner, F., & Hammer, C. (1998). Analysis of the microcirculation during xenogeneic liver perfusion in the guinea pig-rat model. The contribution of leukocytes of the rejection process. *Xenotransplantation*, pp. 11(1):457-460.
- Matsuura, A., Abe, T., & Yasuura, K. (1991, April). Simplified Mouse Cervical Heart Transplantation Using A Cuff Technique. *Transplantation*, pp. 896-933.
- Meiser, B., von Scheidt, W., Weis, M., Böhm, D., Kur, F., Koglin, J., . . . Reichart, B. (1997). Herztransplantation - State of the Art Today. *Herz*, pp. 22:237-52 (Nr.5).
- Menger, M., & Lehr, H. (1993). Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunology Today*, pp. 519 - 522.
- Menger, M., Laschke, M., Amon, M., Schramm, R., Thorlacius, H., & Rucker, M. (2003). Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch Surg*, pp. 388:281-290.
- Michel, P., Vial, R., Rodriguez, C., & Ferrera, R. (2002). A comparative study of the most widely used solutions for cardiac graft preservation during hypothermia. *J Heart Lung Transplant*, pp. 21:1030-1039.
- Miyagawa, S., Hirose, H., Shirakura, R., Naka, Y., Nakata, S., Kawashima, Y., . . . Kitamura, H. (1988, December). The Mechanism Of Discordant Xenograft Rejection. *Transplantation*, pp. Vol 46 Issue 6 - 825-839.
- Nielsen, B., Steinbrüchel, D., Laenkholm, A., & Kemp, E. (1992). The histology at various stages of acute rejection in concordant xenogeneic heart transplantation. A sequential study in rodents. *APMIS*, pp. 100(3):249-55.
- Nielsen, B., Steinbrüchel, D., Lillevang, S., & Kemp, E. (1993). Evidence for a primarily humoral rejection mechanism in concordant xenogeneic heart transplantation. A sequential immunohistological study in a hamster-to-rat model. *APMIS*, pp. 101(8):587-594.
- Ogata, K., & Platt, J. (2004). Cardiac Xenotransplantation: Future and Limitations. *Cardiology*, pp. 144-155.

- Pino-Chavez, G. (2001, vol. 4). Differentiating Acute Humoral from Acute Cellular Rejection Histopathologically. *Graft*, pp. 60-62.
- Platt, J. (2001). The Immunological Hurdles to Cardiac Xenotransplantation. *J Card Surg*, pp. 16:439-447.
- Platt, J., Fischel, R., Matas, A., Reif, S., Bolman, R., & Bach, F. (1991, August). Immunopathology of Hyperacute Xenograft Rejection in A Swine-To-Primate Model. *Transplantation*.
- Platt, J., Lin, S., & McGregor, C. (1998). Acute vascular rejection. *Xenotransplantation*, pp. 169-175.
- Robson, S., Cooper, D., & d'Apice, A. (2000). Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation*, pp. 7:166-176.
- Robson, S., Schulte am Esch II, J., & Bach, F. (1999, Juni). Factors in Xenograft Rejection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 261–276.
- Roos, A., & Daha, M. (2002). Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. *Transplant Immunology*, pp. 257–270.
- Roos, A., Essers, M., van Gijlswijk-Janssen, D., Bovin, N., & Daha, M. (2001). Both IgG and IgM anti-pig antibodies induce complement activation and cytotoxicity. *Xenotransplantation*, pp. 8: 3-14.
- Saetzler, R., Jallo, J., Lehr, H., Philips, C., Vasthare, U., Arfors, K., & Tuma, R. (1997). Intravital Fluorescence Microscopy: Impact of Light-induced Phototoxicity on Adhesion of Fluorescently Labeled Leukocytes. *J Histochem Cytochem*, pp. 4:505-513 .
- Sandrin, M., Fodor, W., Mouthtouris, E., Osman, N., Cohnsey, S., Rollins, S., . . . McKenzie, I. (1995). Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nature Medicine*, pp. 1261-1267.
- Schraa, E., Stockmann, H., Broekhuizen, A., Scheringa, M., Schuurman, H., Marquet, R., & Jzermans, J. (2002). IgG, but not IgM, mediates hyperacute rejection in hepatic xenografting. *Xenotransplantation*, pp. 6(2):110-116.
- Schramm, R., Kirsch, S., HJ, S., Langer, F., Scheuer, C., Nickels, R., & Menger, M. (2010, Oct). Erythropoietin inhibits post-ischemic leukocyte adhesion but does not affect rejection in murine cardiac allografts. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, pp. Volume 29, Issue 10 , Pages 1185-1192.
- Schramm, R., Menger, M., Kirsch, S., Langer, F., Harder, Y., Hamacher, J., & Schäfers, H. (2007). The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: An intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, pp. 134:210-7.
- Schramm, R., Schäfers, H., Hamacher, J., & Menger, M. (2006). Simplified technique for heterotopic vascularized heart transplantation in mice. *Microsurgery*, pp. 26:212-213.
- Seehofer, D., Baatz, H., Thiery, J., Müller-Höcker, J., Müller-Derlich, J., & Hammer, C. (1997). Fluorescence videomicroscopic assessment of xenogeneic microcirculation and impact of antibody removal by immunoadsorption. *Transplantation*, pp. 63(3):460-465.

- Shen, J., Chong, A., Xiao, F., Liu, W., Huang, W., Blinder, L., . . . Williams, J. (1998, September). Histological characterization and pharmacological control of chronic rejection in xenogeneic and allogeneic heart transplantation. *Transplantation*, pp. 66(6): 692-698.
- Shimizu, A., Hisashi, Y., Kuwaki, K., Tseng, Y., Dor, F., Houser, S., . . . Colvin, R. (2008). Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol.*, pp. 172(6):1471-81.
- Simon, A., Templin, C., Schroder, C., Laaff, G., Tessmann, R., Winkler, M., . . . Martin, U. (2005). Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in pig-to baboon xenotransplantation with sustained depletion of anti-alphaGal antibodies. *Transplantation*, pp. 79(7):777-82.
- Sorg, H., Hoffmann, J., Menger, M., Lindenblatt, N., Goehring, P., & Vollmar, B. (2006). Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. *Thrombosis and Haemostasis*, pp. 96/3 (Sep) pp. 239-389.
- Steinbrüchel, D., Nielsen, B., Salomon, S., & Kemp, E. (1992). Sequential, morphological, and antidonor antibody analysis in a hamster-to-rat heart transplantation model. *Transplant Int*, pp. 5:38-42.
- Stewart, S., Winters, G., Fishbein, M., Tazelaar, H., Kobashigawa, J., Abrams, J., . . . Billingham, M. (2005, Nov). Revision of the 1990 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Heart Rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, pp. Volume 24, Issue 11, Pages 1710–1720.
- Teranishi, K., Alwayn, I., Bühler, L., Gollackner, B., Knosalla, C., Huck, J., . . . Cooper, D. (2003, Juli). Depletion of anti-Gal antibodies by the intravenous infusion of Gal type 2 and 6 glycoconjugates in baboons. *Xenotransplantation*, pp. 357-367.
- Tseng, Y., Kuwaki, K., Dor, F., Shimizu, A., Houser, S., Hisashi, Y., . . . Cooper, D. (2005, November). [alpha]1,3-Galactosyltransferase Gene-Knockout Pig Heart Transplantation in Baboons with Survival Approaching 6 Months. *Transplantation*, pp. 1493-1500.
- Xiu, D., Uchida, H., To, H., Sugimoto, K., Kasahara, K., Nagai, H., . . . Kobayashi, E. (2001). Simplified method of heterotopic rat heart transplantation using the cuff technique: application to sublethal dose protocol of methotrexate on allograft survival. *Microsurgery*, pp. 21:16-21.
- Zhang, Z., Bédard, E., Luo, Y., Wang, H., Deng, S., Kelvin, D., & Zhong, R. (2000). Animal models in xenotransplantation. *Expert Opin Investig Drugs*, pp. 9(9):2051-68.
- Zhong, R., Zhang, Z., Kiyochi, H., & Wang, H. (1998). Novel Mouse Models for xenotransplantation Research. *Organtransplantation in Rats and Mice*, pp. pp 605-614 .
- Zhou, C., McInnes, E., Copeman, L., Langford, G., Parsons, N., Lancaster, R., . . . Thompson, S. (2005, Februar). Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation*, pp. 142-148.

10. Danksagungen

Mein Dank gilt allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. René Schramm, PhD für das Überlassen des Themas, die Weitergabe seiner Expertise, die tatkräftige Unterstützung und nicht zuletzt für die Geduld bei der Fertigstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Auch Herrn Dr. med. Stefan Buchholz möchte ich für die Unterstützung mit Rat und Tat herzlich danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hagl, der mir die Promotion an der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München möglich machte.

Herrn Prof. Dr. med. Krombach sowie seinen Arbeitsgruppen danke ich herzlich für die Benutzung seiner Laborräume.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Walter-Brendel-Instituts München für die freundliche Aufnahme im Institut und die Unterstützung bei Problemen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Familie, die mir mein Studium ermöglichten und mich in allen Situationen verständnisvoll unterstützen.

11. Eidesstattliche Versicherung

Geiger, Dominik

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mikrovaskuläre Mechanismen der hyperakuten und akut humoralen Abstoßungsreaktion nach experimenteller Herz-Xenotransplantation im Hamster-Ratte-Modell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand